



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

RECEIVED

JUN 24 2002

TECH CENTER 1600/2900

Applicant : Hiraku Itadani et al.

Art Unit : 1635

Serial No. : 09/891,053

Examiner : Unknown

Filed : June 25, 2001

Title : NOVEL GUANOSINE TRIPHOSPHATE (GTP) BINDING PROTEIN-  
COUPLED RECEPTOR PROTEINS

Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC §119

Applicants hereby confirm their claim of priority under 35 USC §119 from the following application: Japanese Patent Application No. 11/145661, filed May 25, 1999.

A certified copy of each application from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date: June 14, 2002

(Signature)  
Janis K. Fraser, Ph.D., J.D.  
Reg. No. 34,819

Fish & Richardson P.C.  
225 Franklin Street  
Boston, Massachusetts 02110-2804  
Telephone: (617) 542-5070  
Facsimile: (617) 542-8906

20453546.doc

CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Date of Deposit

June 14, 2002

Signature

(Signature)  
Susan R. Jones

Typed or Printed Name of Person Signing Certificate



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

RECEIVED

JUN 24 2002

TECH CENTER 1600/2900

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 5月25日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第145661号

出 願 人  
Applicant(s):

萬有製薬株式会社

2001年 8月17日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造

出証番号 出証特2001-3074126

【書類名】 特許願

【整理番号】 B1-103

【提出日】 平成11年 5月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社つくば  
研究所内

【氏名】 板谷 啓

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社つくば  
研究所内

【氏名】 滝村 哲雄

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社つくば  
研究所内

【氏名】 中村 隆男

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社つくば  
研究所内

【氏名】 小林 正彦

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社つくば  
研究所内

【氏名】 田中 健一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社つくば  
研究所内

【氏名】 日高 裕介

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保 3 番地 萬有製薬株式会社つくば  
研究所内

【氏名】 太田 雅貴

【特許出願人】

【識別番号】 000005072

【氏名又は名称】 萬有製薬株式会社

【代表者】 長坂 健二郎

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【パリ条約による優先権等の主張】

【国名】 世界知的所有権機関

【出願日】 1998年12月25日

【出願番号】 PCT/JP98/05967

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規なグアノシン三リン酸 (GTP) 結合タンパク質共役型の  
レセプタータンパク質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記 (a) または (b) に記載のアミノ酸配列からなるグア  
ノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質：

(a) 配列番号：20 に記載のアミノ酸配列；

(b) 配列番号：20 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸  
が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列。

【請求項 2】 ヒスタミンとの結合活性を有する、請求項 1 に記載のタンパ  
ク質。

【請求項 3】 ヒスタミン刺激に応答して細胞内の cAMP 濃度またはカルシウ  
ム濃度を変化させる活性を有する、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 4】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のレセプタータンパク質の  
部分ペプチド。

【請求項 5】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のレセプタータンパク質ま  
たは請求項 4 に記載の部分ペプチドをコードする DNA。

【請求項 6】 配列番号：21 に記載の塩基配列のコード領域を含む請求項  
5 に記載の DNA。

【請求項 7】 請求項 5 または 6 に記載の DNA を含有することを特徴とする  
ベクター。

【請求項 8】 請求項 7 に記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項 9】 請求項 8 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1  
から 3 のいずれかに記載のレセプタータンパク質または請求項 4 に記載の部分ペ  
プチドの製造方法。

【請求項 10】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のレセプタータンパク質  
に結合するリガンドまたはそのアナログのスクリーニング方法であって、

(a) 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のレセプタータンパク質または請求項 4  
に記載の部分ペプチドに被検化合物を接触させる工程、

(b) 該タンパク質または部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 1 1】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のレセプタータンパク質とそのリガンドまたは該リガンドのアナログとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で請求項 1 から 3 のいずれかに記載のレセプタータンパク質または請求項 5 に記載の部分ペプチドにリガンドまたはそのアナログを接触させ、該タンパク質またはその部分ペプチドとリガンドまたはそのアナログとの結合活性を検出する工程、

(b) 被検化合物非存在下での結合活性と比較して、工程 (a) で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 1 2】 リガンドがヒスタミンである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のレセプタータンパク質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で該タンパク質を発現する細胞に該タンパク質のリガンドまたはそのアナログを接触させる工程、

(b) 該リガンドまたはそのアナログの該タンパク質への結合による細胞における変化を検出する工程、

(c) 被検化合物非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 1 4】 リガンドがヒスタミンである、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】 検出する細胞における変化が、cAMP濃度の変化、カルシウム濃度の変化、Gタンパク質の活性化、ホスホリパーゼCの活性化、およびpHの変化からなる群より選択される、請求項 1 3 または 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のレセプタータンパク質または請求項 4 に記載の部分ペプチドを含有することを特徴とする、請求項 1 0 から 1 5 のいずれかのスクリーニングのためのキット。

【請求項 1 7】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のレセプタータンパク質

に結合する抗体。

【請求項 1 8】 請求項 1 1 から 1 5 のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物。

【請求項 1 9】 請求項 1 8 に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なヒト由来グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質、該タンパク質をコードするDNA、並びにこれらを利用した医薬品候補化合物のスクリーニング方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプタータンパク質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプタータンパク質の多くは共役しているグアノシン三リン酸結合タンパク質(以下、「Gタンパク質」と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行なっている。このため、このレセプタータンパク質はGタンパク質共役型レセプタータンパク質と総称されている。あるいは7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、7回膜貫通型レセプタータンパク質とも総称されている。

【0 0 0 3】

Gタンパク質共役型レセプタータンパク質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として非常に重要な役割を担っている。このため、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質は医薬品開発の標的として非常に注目されている。

【0 0 0 4】

Gタンパク質共役型レセプタータンパク質としては、これまでにムスカリン性アセチルコリン・レセプターM1、M2、M3、M4 (Peralta, E. G. et al., EMBO J. 6, 3923-3929 (1987))、ムスカリン性アセチルコリン・レセプターM5 (Bonner

, T. I. et al., *Neuron* 1, 403-410 (1988))、アデノシン・レセプターA1 (Libert, F. et al., *Science* 244, 569-572 (1989))、 $\alpha 1A$ アドレノレセプター (Bruno, J. F. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 1485-1490 (1991))、 $\beta 1$ アドレノセプター (Frielle, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7920-7924 (1987))、アンジオテンシン・レセプターAT<sub>1</sub> (Takayanagi, R., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183, 910-916 (1992))、エンドセリン・レセプターET<sub>A</sub> (Adachi, M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 1265-1272 (1991))、ゴナドトロピン放出因子レセプター (Kaker, S. S. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 289-295 (1992))、ヒスタミン・レセプターH<sub>2</sub> (Ruat, M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1658-1672 (1992))、神経ペプチドYレセプターY1 (Larhammar, D. et al., *J. Biol. Chem.* 267, 10935-10938 (1992))、インターロイキン8・レセプターIL8R<sub>A</sub> (Holmes, W. E. et al., *Science* 2563, 1278-1280 (1991))、ドーパミン・レセプターD<sub>1</sub> (Mahan, L. C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2196-2200 (1990))、代謝型グルタミン酸レセプターmGluR1 (Masu M. et al., *Nature* 349, 760-765 (1991))、ソマトスタチン・レセプターSS<sub>1</sub> (Yamada Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 251-255) などが報告されている (参考文献: Watson, S. and Arkinstall, S., *The G-Protein Linked Receptor FactsBook*, Academic Press (1994))。また、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を標的とした医薬品としては、塩酸テラゾシン (血圧降下剤、 $\alpha 1$ アドレノセプター・アンタゴニスト)、アテノロール (不整脈用剤、 $\beta 1$ アドレノセプター・アンタゴニスト)、塩酸ジサイクロミン (鎮痙剤、アセチルコリン・レセプター・アンタゴニスト)、塩酸ラニチジン (消化性潰瘍治療剤、ヒスタミン・レセプターH<sub>2</sub>・アンタゴニスト)、塩酸トラゾドン (抗うつ剤、セロトニン・レセプター5-HT<sub>1B</sub>・アンタゴニスト)、塩酸ブプレノルフィン (鎮痛剤、オピオイド・レセプター $\kappa$ ・アゴニスト) などが開発されている (参考文献: Stadel, J. M. et al., *Trends Pharm. Sci.* 18, 430-437 (1997); 医薬品要覧第5版、薬業時報社)。

【0005】

ところで、脳の一部である視床下部は、自律神経系の中核として特定の反応を



引き起こす種々のプログラムを有しており、様々な出力系を介して内部環境の恒常性に寄与している。例えば、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出ホルモンなどのホルモンを放出し、標的細胞に発現している特異的な受容体に対するこれらホルモンの作用を介して、全身の内分泌系を調節している。このような視床下部における出力系には、視床下部における受容体とそれに作用する物質が関与していると考えられている。このため、視床下部の出力系を調節している物質と視床下部におけるその特異的レセプターとの関係を明らかにすることは、内分泌異常などに起因する疾患の治療などための医薬品開発において非常に重要な手段であるといえる。

## 【 0 0 0 6 】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、脳（特に、視床や視床下部など）に発現する新規なヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を提供することを課題とする。さらに、本発明は、該レセプタータンパク質を利用したリガンドおよび医薬品の候補化合物のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

## 【 0 0 0 7 】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために、まず、既知のGタンパク質共役型レセプタータンパク質において高度に保存されている領域を独自に抽出し、これに対応するプライマーを設計してラット視床及び視床下部由来のmRNAに対し逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を行った。次いで、これにより増幅された多くのクローンの中から無作為にクローンを選択し、その部分的な塩基配列の決定を行った。そして、塩基配列の決定を行ったクローンの中から公知のクローンを消去するために、類似性検索により公知のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードすると判断されたクローンのcDNAをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションを行ない、いずれのプローブにもハイブリダイズしない陰性クローンを選択した。そして、この陰性クローンの塩基配列に基づきプローブを調製し、ラット視床及び視床下部由来のcDNAライブラリーのスクリーニングを行うことにより、ラットGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードする

全長cDNAを単離した。

【0008】

さらに本発明者等は、特異的プローブを用いたヒト海馬ライブラリーのスクリーニングを行い、該ラットcDNAに対応するヒトcDNAを単離することに成功した。

【0009】

単離したヒトcDNAがコードするGタンパク質共役型レセプタータンパク質のリガンドを同定するために、本発明者等は、該タンパク質を発現する細胞を調製し、該タンパク質を刺激することにより該細胞内のcAMP濃度を变化させる化合物のスクリーニングを行なった。その結果、本発明者等は、ヒスタミンが細胞表面に発現したヒトGタンパク質共役型レセプタータンパク質を刺激して細胞内のcAMP濃度を低下させる活性を有することを見出した。さらに、ヒスタミンが実際に該タンパク質に結合する活性を有することを見出した。

【0010】

本発明者等により見出されたGタンパク質共役型レセプタータンパク質は、そのアゴニストやアンタゴニストのスクリーニングにおいて非常に有用なツールとなり、また、該スクリーニングにより単離されたアゴニストやアンタゴニストは医薬品としての利用が期待される。

【0011】

従って、本発明は、脳に発現する新規なヒト由来Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質、該タンパク質をコードするDNA、および該タンパク質を利用したリガンドや医薬品候補化合物のスクリーニングに関する。

【0012】

より具体的には、

(1) 下記(a)または(b)に記載のアミノ酸配列からなるグアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質：

(a) 配列番号：20に記載のアミノ酸配列；

(b) 配列番号：20に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列、

(2) ヒスタミンとの結合活性を有する、(1)に記載のタンパク質、

(3) ヒスタミン刺激に応答して細胞内のcAMP濃度またはカルシウム濃度を変化させる活性を有する、(1)に記載のタンパク質、

(4) (1)から(3)のいずれかに記載のレセプタータンパク質の部分ペプチド、

(5) (1)から(3)のいずれかに記載のレセプタータンパク質または(4)に記載の部分ペプチドをコードするDNA、

(6) 配列番号：21に記載の塩基配列のコード領域を含む(5)に記載のDNA、

(7) (5)または(6)に記載のDNAを含有することを特徴とするベクター、

(8) (7)に記載のベクターを保持する形質転換体、

(9) (8)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1)から(3)のいずれかに記載のレセプタータンパク質または(4)に記載の部分ペプチドの製造方法、

(10) (1)から(3)のいずれかに記載のレセプタータンパク質に結合するリガンドまたはそのアナログのスクリーニング方法であって、

(a) (1)から(3)のいずれかに記載のレセプタータンパク質または(4)に記載の部分ペプチドに被検化合物を接触させる工程、

(b) 該タンパク質または部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法、

(11) (1)から(3)のいずれかに記載のレセプタータンパク質とそのリガンドまたは該リガンドのアナログとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で(1)から(3)のいずれかに記載のレセプタータンパク質または(5)に記載の部分ペプチドにリガンドまたはそのアナログを接触させ、該タンパク質またはその部分ペプチドとリガンドまたはそのアナログとの結合活性を検出する工程、

(b) 被検化合物非存在下での結合活性と比較して、工程(a)で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(12) リガンドがヒスタミンである、(11)に記載の方法、

(13) (1) から (3) のいずれかに記載のレセプタータンパク質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で該タンパク質を発現する細胞に該タンパク質のリガンドまたはそのアナログを接触させる工程、

(b) 該リガンドまたはそのアナログの該タンパク質への結合による細胞における変化を検出する工程、

(c) 被検化合物非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(14) リガンドがヒスタミンである、(13)に記載の方法、

(15) 検出する細胞における変化が、cAMP濃度の変化、カルシウム濃度の変化、Gタンパク質の活性化、ホスホリパーゼCの活性化、およびpHの変化からなる群より選択される、(13)または(14)に記載の方法、

(16) (1) から (3) のいずれかに記載のレセプタータンパク質または(4)に記載の部分ペプチドを含有することを特徴とする、(10) から (15) のいずれかのスクリーニングのためのキット、

(17) (1) から (4) のいずれかに記載のレセプタータンパク質に結合する抗体、

(18) (11) から (15) のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物、

(19) (18)に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物、に関する。

#### 【0013】

なお、本発明において「Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質」とは、Gタンパク質の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行なっているレセプタータンパク質を指す。

#### 【0014】

本発明において「リガンド」とは、Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質に結合して、シグナル伝達を誘導する能力を有する天然の化合物を指す。「リ

ガンドのアナログ」とは、Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質に結合するリガンドと同様の生理活性を有するか、もしくはリガンドの生理活性を抑制するリガンドの誘導体を指し、天然の化合物および人工的に合成された化合物の双方が含まれる。例えば、ヒスタミンとR(-)- $\alpha$ -メチルヒスタミンは、リガンドとそのアナログの関係にある。

【0015】

本発明において「アゴニスト」とは、Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質のリガンドと同様の生理活性を有する化合物を指し、天然の化合物および人工的に合成された化合物の双方が含まれる。

【0016】

本発明において「アンタゴニスト」とは、Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質のリガンドの生理活性を抑制する能力を有する化合物を指し、天然の化合物および人工的に合成された化合物の双方が含まれる。

【0017】

本発明における「タンパク質」および「ペプチド」にはその塩も含まれる。

【0018】

【発明の実施の形態】

本発明は、新規なヒトGタンパク質共役型レセプタータンパク質に関する。本発明等により単離されたヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質「BG2」のcDNAの塩基配列を配列番号：21に、「BG2」タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：20に示す。

【0019】

ヒト「BG2」タンパク質は、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるヒト由来 $\alpha$ -2C-1アドレノセプター (Regan, J. W. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85, 6301-6305(1988))、マウス由来 $\beta$ -1アドレノセプター (Jasper J. R. et al., Biochem. Biophys. Acta 1178, 307-309(1993))、ヒト由来ムスカリン性アセチルコリンレセプターM3 (Peralta, E. G. et al., EMBO J. 6, 3923-3929(1987))とそれぞれ32%、28%、27%のホモロジーを有する。この事実、は、「BG2」タンパク質が、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質ファミリーに属する

ことを示している。そして、「BG2」タンパク質がGタンパク質共役型レセプタータンパク質であることは、そのリガンドの作用によりG蛋白質の活性化を通じてシグナル伝達を行っていることを示している。実際に、ヒト「BG2」タンパク質はヒスタミンに結合する活性を有し、また、ヒスタミンの刺激に応答して細胞内のcAMP濃度を低下させる活性を有していた。本発明のヒト「BG2」タンパク質は、脳（海馬など）に発現していた。脳において海馬は記憶や学習に重要な役割を担い、小脳は体性運動の制御を行い、視床下部は自律神経系の中枢である。「BG2」蛋白質はこれら機能の調節に関与していると考えられる。従って、本発明のヒト「BG2」タンパク質やその遺伝子、該タンパク質の機能を調節し得るアゴニストやアンタゴニストは、記憶・学習障害の改善や、血圧、消化、体温、摂食等の自律神経系の調節への応用が考えられる。

【0020】

ヒト「BG2」タンパク質は、天然のタンパク質の他、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として調製することができる。天然のタンパク質は、例えば、ヒト「BG2」タンパク質が発現していると考えられる脳組織の抽出液に対し、後述する「BG2」抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行う方法により調製することが可能である。一方、組換えタンパク質は、後述するようにヒト「BG2」タンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。また、当業者であれば、公知の方法を用いて天然型のヒト「BG2」タンパク質（配列番号：20）中のアミノ酸の置換などの修飾を行い、天然型のタンパク質と同等の機能または活性（グアノシン三リン酸結合タンパク質の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行なう機能、ヒスタミンとの結合活性、ヒスタミン刺激に応答して細胞内のcAMP濃度もしくはカルシウム濃度を変化させる活性）を有する改変タンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加などにより天然型のタンパク質に対してアミノ酸配列が変異した変異体であって、天然型のタンパク質と同等の機能を有するタンパク質も本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に含まれる。当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、Kunkel法（Kunkel, T. A. et al.

, Methods Enzymol. 154, 367-382 (1987))、ダブルプライマー法 (Zoller, M. J. and Smith, M., Methods Enzymol. 154, 329-350 (1987))、カセット変異法 (Wells, et al., Gene 34, 315-23 (1985))、メガプライマー法 (Sarkar, G. and Sommer, S. S., Biotechniques 8, 404-407 (1990)) が挙げられる。機能的に同等なタンパク質におけるアミノ酸の変異数は、通常、全アミノ酸の10%以内、好ましくは10アミノ酸以内、さらに好ましくは3アミノ酸以内 (例えば、1アミノ酸) である。

## 【0021】

また、本発明は、上記本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の部分ペプチドを包含する。本発明の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のN末端領域の部分ペプチドが挙げられ、該ペプチドは抗体の調製に利用することができる。また、ヒスタミンとの結合活性を有するペプチドや細胞表面に発現させた場合にヒスタミン刺激に応答して細胞内cAMP濃度もしくはカルシウム濃度を変化させる活性を有するペプチドが挙げられ、これらペプチドは後述する医薬品候補化合物のスクリーニングに利用することができる。また、ヒスタミンとの結合活性を有するが細胞内へのシグナル伝達を行なう活性を有しない部分ペプチドは、本発明の「BG2」タンパク質の競合阻害剤になり得る。このような本発明の部分ポリペプチドは、少なくとも15アミノ酸、好ましくは20アミノ酸以上の鎖長を有すると考えられる。

## 【0022】

また、本発明は、上記本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAに関する。本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質やその部分ペプチドをコードするDNAとしては、これらタンパク質や部分ペプチドをコードしうるものであれば特に制限はなく、cDNA、ゲノムDNA、および合成DNAが含まれる。本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAは、例えば、配列番号：21に記載のcDNAあるいはその断片、それらに相補的なRNA、または該cDNAの配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを<sup>32</sup>Pなどで標識し、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質が発現している組織 (例えば、脳組織) 由来のcDNAライブラリ

ーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これらcDNAの塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、適当な組織（例えば、脳組織）由来のcDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。ゲノムDNAは、例えば、配列番号：21に記載のcDNAあるいはその断片、それらに相補的なRNA、または該cDNAの配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを $^{32}$ Pなどで標識し、ゲノムDNAライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これらcDNAの塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、ゲノムDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。一方、合成DNAは、例えば、配列番号：21に記載のcDNAの部分配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成し、アニーリングさせて二本鎖にし、DNAリガーゼで結合させることにより調製することができる（Khorana, H. G. et al., J. Biol. Chem. 251, 565-570 (1976); Goeddel D. V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 106-110 (1979)）。

## 【0023】

これらDNAは、組換えタンパク質の生産に有用である。即ち、上記本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：21に記載のDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を精製することにより本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を組換えタンパク質として調製することが可能である。本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質はレセプタータンパク質であるため、細胞膜に発現させて調製することが可能である。

## 【0024】

具体的には、宿主が大腸菌エシェリシア・コリ (*Escherichia coli*) の場合、プラスミドベクターpET-3 (Rosenberg, A. H. et al., Gene 56, 125-35 (1987))、pGEX-1 (Smith, D. B. and Johnson, K. S., Gene 67, 31-40 (1988)) などが用いられる。大腸菌の形質転換は、Hanahan法 (Hanahan, D., J. Mol. Biol. 166, 557-580 (1983))、電気穿孔法 (Dower, W. J. et al., Nucl. Acids Res.



16, 6127-6145 (1988)) などで行う。宿主が分裂酵母シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) の場合には、プラスミドベクター pESP-1 (Lu, Q. et al., *Gene* 200, 135-144 (1997)) などが用いられる。酵母の形質転換は、例えば、スフェロプラスト法 (Beach, D. and Nurse, P., *Nature* 290, 140 (1981))、酢酸リチウム法 (Okazaki, K. et al., *Nucleic Acids Res.* 18, 6485-6489 (1990)) などにより行なわれる。

## 【 0 0 2 5 】

一方、宿主がほ乳動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞CH O、ヒトHeLa細胞などの場合、pMSG (クロンテック社) などのベクターが用いられる。ほ乳動物細胞への組換えDNAの導入は、リン酸カルシウム法 (Graham, F. L. and van derEb, A. J., *Virology* 52, 456-467 (1973))、DEAE-デキストラン法 (Sussman, D. J. and Milman, G., *Mol. Cell. Biol.* 4, 1641-1643 (1984))、リポフェクション法 (Felgner, P. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 84, 7413-7417 (1987))、電気穿孔法 (Neumann, E. et al., *EMBO J.* 1, 841-845 (1982)) などで行われる。宿主が昆虫細胞の場合には、バキュロウイルスベクター pBacPAK8/9 (クロンテック社) などが用いられる。昆虫細胞の形質転換は、例えば、バイオテクノロジー (*Bio/Technology*) ,6, 47-55 (1980)) などに記載の方法に従って行なうことができる。

## 【 0 0 2 6 】

宿主細胞において発現させた組換えタンパク質は、公知の方法により精製することができる。また、例えば、N末端にヒスチジン残基のタグ、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) などを結合した融合タンパク質の形で合成し、金属キレート樹脂、GST親和性レジンに結合させることにより精製することができる (Smith, M. C. et al., *J. Biol. Chem.* 263, 7211-7215 (1988))。例えば、ベクターとして pESP-1 を用いた場合、目的のタンパク質は、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として合成されるため、GST親和性レジンに結合させることより組換えタンパク質を精製できる。融合タンパク質から目的タンパク質を分離するには、例えば、トロンピン、血液凝固因子Xaなどで切断する。

【 0 0 2 7 】

本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNAは、その変異に起因する疾患の遺伝子治療に応用することも可能である。遺伝子治療に用いる場合には、ヒト細胞への遺伝子導入には、レトロウイルスベクター（Danos, O. and Mulligan, R. C., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 85, 6460-6464 (1988) ; Dranoff, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90, 3539-3543 (1993)）、アデノウイルスベクター（Wickham, T. J. et al., Cell 73, 309-319 (1993)）などを用いる方法が用いられている。患者への投与方法としては、骨髄移植、皮下注射、静脈注射などが用いられる（Asano, S., 蛋白質核酸酵素, 40, 2491-2495 (1995)）。

【 0 0 2 8 】

また、本発明は、本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質に結合する抗体に関する。本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質に結合する抗体は、当業者に公知の方法（例えば、「新生化学実験講座 1 , タンパク質 I , 389-406, 東京化学同人」参照）により調製することが可能である。ポリクローナル抗体の調製は、例えば、以下の如く行う。ウサギ、モルモット、マウス、ニワトリなどの免疫動物に適量の上記タンパク質またはペプチドを投与する。投与は、抗体産生を促進するアジュバント（FIAやFCA）と共に行ってもよい。投与は、通常、数週間ごとに行う。免疫を複数回行うことにより、抗体価を上昇させることができる。最終免疫後、免疫動物から採血を行うことにより抗血清が得られる。この抗血清に対し、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製を行うことにより、ポリクローナル抗体を調製することができる。一方、モノクローナル抗体の調製は、例えば、以下の如く行う。本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを、上記と同様に免疫動物に免疫し、最終免疫後、この免疫動物から脾臓またはリンパ節を採取する。この脾臓またはリンパ節に含まれる抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコールなどを用いて融合し、ハイブリドーマを調製する。目的のハイブリドーマをスクリーニングし、これを培養し、その培養上清からモノクローナル

抗体を調製することができる。モノクローナル抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製により行うことができる。これにより調製された抗体は、本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質のアフィニティー精製のために用いられる他、本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現異常に起因する疾患の検査や抗体治療、本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量の検出などに利用することが可能である。

## 【0029】

抗体治療に用いる場合、ヒト型抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。ヒト型抗体は、例えば、マウスーヒトキメラ抗体であれば、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対する抗体を産生するマウス細胞から抗体遺伝子を単離し、そのH鎖定常部をヒトIgE H鎖定常部遺伝子に組換え、マウス骨髓腫細胞J558Lに導入することにより調製できる (Neuberger, M. S. et al., Nature 314, 268-270 (1985))。また、ヒト抗体は、免疫系をヒトと入れ換えたマウスに本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を免疫することにより調製することが可能である。

## 【0030】

また、本発明は、本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドまたはそのアナログのスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法においては、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドに被検化合物を接触させ、これらタンパク質もしくはペプチドに結合する化合物を選択する工程を含む。被検化合物としては、例えば、アセチルコリン、アデノシン、アドレナリン、ノルアドレナリン、アンジオテンシン、ボムベシン、ブラジキニン、C5aアナフィラトキシン、カルシトニン、カナビノイド、ケモカイン、コレシストキニン、ドーパミン、エンドセリン、フォルミルメチオニルペプチド、GABA、ガラニン、グルカゴン、グルタミン酸、グリコペプチドホルモン、ヒスタミン、5-ヒドロキシトリプトファン、ロイコトリエン、メラノコルチン、神経ペプチドY、ニューロテンシン、オドラント、オ

ピオイドペプチド、オプシン、パラサイロイドホルモン、血小板活性化因子、プロスタノイド、ソマトスタチン、タキキニン、トロンビン、サイロトロピン放出ホルモン、バソプレシン、オキシトシン (Watson, S. and Arkinstall, S., The G-Protein Linked Receptor FactsBook, Academic Press (1994)) などの公知の化合物またはそのアナログ、その他の精製タンパク質、遺伝子 (ライブラリーも含む) の発現産物、リガンドが存在していることが予想される組織もしくは細胞 (例えば、脳、視床、視床下部) の抽出液、細胞培養上清などが用いられる。スクリーニングに用いる本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質は、例えば、所望の細胞 (該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む) 内または細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。スクリーニングに用いる被検化合物は、必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質と被検化合物との結合は、本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質に結合した化合物に付された標識による検出 (例えば、結合量を放射活性や蛍光強度により検出する) のほか、被検化合物の細胞表面上の本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質への結合による細胞内へのシグナル伝達 (例えば、Gタンパク質の活性化、 $Ca^{2+}$  またはcAMPの濃度変化、ホスホリパーゼCの活性化、pHの変化) を指標に検出することもできる。具体的な方法については、例えば、文献 (Cell Calcium 14,663-671(1993)、Analytical Biochemistry 226,349-354(1995)、J.Biol.Chem. 268,5957-5964(1993)、Cell 92,573-585(1998)、Nature 393,272-273(1998)) や公報 (特開平9-268号公報) の記載に準じて行うことができる。その他、TWOハイブリッドシステム (Zervos et al., Cell 72,223-232(1994)、Fritz et al., Nature 376,530-533(1995)) を利用したレポーター遺伝子の活性の検出によっても結合を検出することができる。

【0031】

また、本発明は、本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質とそのリガンドまたはリガンドのアナログとの結合を阻害する活性を有する化合

物のスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法は、(a) 被検化合物の存在下で本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその部分ペプチドにリガンドまたはそのアナログを接触させ、該タンパク質またはその部分ペプチドとリガンドまたはそのアナログとの結合活性を検出する工程、および (b) 工程 (a) で検出された結合活性を、被検化合物非存在下での結合活性と比較し、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドまたはそのアナログとの結合活性を低下させる化合物を選択する工程を含む。被検化合物としては、タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、人工的に合成された化合物、組織や細胞の抽出液、血清などが挙げられるが、これらに制限されない。スクリーニングに用いる本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質は、例えば、所望の細胞（該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む）内または細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。スクリーニングに利用するリガンドは必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。また、リガンドとしては、例えば、ヒスタミンを好適に用いることができる。また、ヒスタミンのアナログ、例えば、R(-)- $\alpha$ -メチルヒスタミンを用いることも可能である。

## 【0032】

本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその部分ペプチドとリガンドまたはそのアナログとの結合活性は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質やその部分ペプチドに結合したリガンドまたはそのアナログに付された標識による検出（例えば、結合量を放射活性や蛍光強度により検出する）のほか、被検化合物の細胞表面上の本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質への結合による細胞の変化（例えば、Gタンパク質の活性化、 $Ca^{2+}$  またはcAMPの濃度変化、ホスホリパーゼCの活性化、pHの変化）を指標に検出することもできる。具体的な方法については、例えば、実施例に記載のZlokar mikらの方法（Science 1998, vol.279, p.84）を利用することが可能である。また、文献（Cell Calcium 14,663-671(1993)、Analytical Biochemistry 226,349

-354(1995)、J.Biol.Chem.268,5957-5964(1993)、Cell 92,573-585(1998)、Nature 393,272-273(1998)) や公報 (特開平9-268号公報) の記載に準じて行うことができる。検出の結果、被検化合物の存在下における結合活性が、被検化合物の非存在下における結合活性 (対照) より低い値を示した場合には、該被検化合物は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその部分ペプチドとリガンドまたはそのアナログとの結合を阻害する活性を有すると判定される。このような化合物は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に結合して細胞内へのシグナル伝達を誘導する活性を有する化合物 (アゴニスト) および該活性を有しない化合物 (アンタゴニスト) などが含まれる。アゴニストは、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドと同様の生理活性を有しており、一方、アンタゴニストは、本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドが有する生理活性を抑制する。このため、これらアゴニストやアンタゴニストは、本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を介したシグナル伝達系の異常などに起因する疾患の治療などのための医薬組成物として有用である。

## 【 0 0 3 3 】

また、本発明は、本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法に関する。このスクリーニング方法は、(a) 被検化合物の存在下で本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を発現する細胞に該タンパク質のリガンドまたはそのアナログを接触させる工程、(b) 該リガンドまたはそのアナログの該タンパク質への結合による細胞における変化を検出する工程、および(c) 被検化合物非存在下での細胞における変化と比較して、工程(b)で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法である。被検化合物としては、タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、人工的に合成された化合物、組織や細胞の抽出液、血清などが挙げられるが、これらに制限されない。上記の結合活性の阻害を指標としたスクリーニングにより単離された化合物を被検化合物として用いることも考えられる。本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を発現する細胞は、例えば、実施例5に記載され

たように、該タンパク質をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な動物細胞に導入することにより調製することができる。該発現ベクターには、形質転換体を選別するためのマーカー遺伝子が挿入されていてもよい。本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を刺激するためのリガンドとしては、例えば、ヒスタミンを好適に用いることができる。また、ヒスタミンのアナログ、例えば、R(-)- $\alpha$ -メチルヒスタミンを用いることも可能である。

## 【 0 0 3 4 】

リガンドやそのアナログが本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質へ結合することによる細胞における変化は、例えば、Gタンパク質の活性化、 $\text{Ca}^{2+}$  またはcAMPの濃度変化、ホスホリパーゼCの活性化、pHの変化を指標に検出することもできる。具体的な方法については、例えば、実施例6に記載のZlokarmikらの方法 (Science 1998, vol.279, p.84) を利用することが可能である。また、文献 (Cell Calcium 14,663-671(1993)、Analytical Biochemistry 226,349-354(1995)、J.Biol.Chem.268,5957-5964(1993)、Cell 92,573-585(1998)、Nature 393,272-273(1998)) や公報 (特開平9-268号公報) の記載に準じて行うことができる。

## 【 0 0 3 5 】

この検出の結果、被検化合物非存在下においてリガンドやそのアナログを作用させた場合の細胞における変化と比較して、細胞における変化が抑制されれば、用いた被検化合物は、本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の活性を阻害する化合物であると判定される。逆に、被検化合物が該細胞における変化を増強させれば、該化合物は、本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の活性を促進する化合物であると判定される。

## 【 0 0 3 6 】

本発明のスクリーニング方法により単離される化合物 (本発明のタンパク質のアゴニストやアンタゴニスト) は、例えば、注意欠如行動多加疾患、アルツハイマー病、記憶障害、認識障害、精神分裂病、睡眠障害、不眠症、睡眠性無呼吸症候群、睡眠発作、関節リュウマチ、変形性関節症、胃潰瘍、炎症性腸疾患、虚血

性心疾患、不整脈、高及び低血圧症、てんかん、肥満、拒食症、鬱病、不安、偏頭痛、喘息、ハンチントン舞踏病、疼痛、ニコチン禁断症状 (Trends in Pharmacological Science, vol 19, 1998, 177-183, Stark, H. et al., Drugs of the Future 21, 507-520 (1996), Onodera, K. and Watanabe, T., Jpn. J. Psychopharmacol. 15, 87-102 (1995)) への応用が考えられる。これら化合物を薬剤として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、結合剤、滑沢剤、甘味料、香料、および着色剤などと適宜組み合わせることで製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。

## 【0037】

また、本発明は、本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを含有することを特徴とする、上記本発明のスクリーニングのためのキットに関する。本発明のキットにおける本発明のヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドは、例えば、所望の細胞（該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む）内または細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。本発明のキットの他の要素としては、上記レセプタータンパク質標品以外に、例えば、リガンド標品（標識されたもの、および標識されていないもの）、リガンドとレセプタータンパク質の反応のための緩衝液、洗浄液などが含まれていてもよい。リガンドに付される標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられる。本発明のキットの利用は、公報（特開平9-268号公報）の記載に準じて行うことができる。また、例えば、実施例6に記載のcAMP濃度の変化の検出系や実施例7に記載の結合活性の検出系を利用したスクリーニングにおいて本発明のキットを利用することができる。



【0038】

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0039】

[実施例 1] ラットGタンパク質共役型受容体遺伝子の単離

Gタンパク質共役型受容体は、細胞膜を7回貫通するという構造上の特徴を有し、膜貫通領域およびその近傍のアミノ酸配列はしばしばよく保存されている。本発明者らは、まず、既知のGタンパク質共役型受容体であるマウス神経ペプチドY受容体Y1(GenBank Accession Number Z18280)、ラットY1(同Z11504)、ヒトY1(同M84755)、マウス神経ペプチドY受容体Y4(同U40189)、ラットY4(同Z68180)、ヒトY4(同Z66526)、マウス神経ペプチドY受容体Y6(同U58367)において高度に保存されている第2膜貫通領域および第7膜貫通領域のDNA配列の比較から、それぞれ配列番号:3で表される新規センスプライマー、配列番号:4で表される新規アンチセンスプライマーを合成した。

【0040】

次いで、ラット(*Rattus norvegicus*)視床および視床下部由来ポリ(A)<sup>+</sup>RNAから、RNA-PCRキット(宝酒造社)を用いて一本鎖cDNAを合成し、これら2本のプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)をおこなった。具体的には、ラット視床および視床下部から、ファストトラック2.0キット(インビトロジェン社)を用いてポリ(A)<sup>+</sup>RNAを精製した。RNA-PCRキット(宝酒造社)のプロトコルにしたがって、精製したポリ(A)<sup>+</sup>RNA 75ngから相補鎖DNAを合成した。cDNA全量を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅をおこなった。反応液の組成は、各0.15mM dNTPs、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.025U/μl rTaqポリメラーゼ(宝酒造社)、各0.5μM ディジェネレートプライマーFg(配列番号:3)およびRb(配列番号:4)、10×酵素付属PCRバッファーで、総反応液量130μlとした後、20μlずつ6本に分注した。ペルティエサーマルサイクラーPTC200(MJリサーチ社)で、94℃2分、「94℃30秒、48℃1分、72℃1分30秒」を35サイクル、72℃8分の条件でPCRをおこなった。PCR反応後、6本の反応液を1本に集め、ウィザードPC

R精製キット（プロメガ社）を用いて増幅産物を精製し、30  $\mu$ lのTEで溶出した。このうち2  $\mu$ lを、TOPO TAクローニングキット（インビトロジェン社）のpCR2.1ベクターにクローニングした。宿主にはXL1-Blueを用い、E.coliパルサー（バイオラッド社）で形質転換した。得られた形質転換体のうち、白色または薄青色のコロニーを、遺伝子ライブラリー作製装置バイオピック（バイオロボティックス社）を用いて、5,760個を無作為に選択し、384ウェルプレート15枚に分注した、100  $\mu$ g/mlアンピシリン入りLB培地に植菌した。クローンを37°Cで一晩培養し、遺伝子ライブラリー複製装置バイオグリッド（バイオロボティックス社）を用いて、グリセロールストック用に100  $\mu$ g/mlアンピシリン、25%グリセロール入りLB寒天培地に載せたフィルター上、およびコロニーハイブリダイゼーション用に100  $\mu$ g/mlアンピシリン入りLB寒天培地に載せたフィルター上に、それぞれ1枚ずつレプリカを作成した。

#### 【0041】

得られたPCRクローンの中には、NPY受容体cDNAが多数重複して存在すると予想されたため、得られた5,760クローンから80クローンを無作為に選び、部分塩基配列を決定した。塩基配列決定のための鋳型にはプラスミド自動単離装置PI100  $\Sigma$ （倉敷紡績社）で精製したプラスミドDNAを、酵素反応にはダイプライマーサイクルシーケンシングキットFS（パーキンエルマー社）を、反応産物の電気泳動にはDNAシーケンサー377（パーキンエルマー社）を用いた。ウィスコンシン・パッケージ（ジェネティック・コンピュータ・グループ社）のblastプログラムで、得られた配列を類似性検索にかけた結果、80個のうち29個はコイルドコイル様タンパク質1（GenBank Accession Number U79024）の、17個は神経ペプチドY受容体Y1 同Z11504）のcDNAであった。そこで、これら2種類のcDNA断片をプローブに用いて、それぞれディジェネレートPCR増幅断片ライブラリーフィルターにハイブリダイズした。プローブは、それぞれのクローンの挿入断片をPCRで増幅し、ウィザードPCR精製キット（プロメガ社）で精製し、プライム-イットIIランダムプライマーラベリングキット（ストラタジーン社）を用いて、 $[\alpha\text{-}^3\text{H}]$ dCTPで標識したものをを用いた。コロニーハイブリダイゼーションは常法にしたがって行った（Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual 2nd

edn., (1989))。コイルドコイル様タンパク質1に対しても神経ペプチドY受容体Y1に対しても陰性のクローンについて部分塩基配列を決定した。塩基配列決定のための鋳型には、各クローンの培養液からPCRで挿入断片を増幅し、PCR産物精製用キット（アマシャム社）で精製したDNAを用いた。酵素反応にはダイプライマーサイクルシーケンシングキットFSを、反応産物の電気泳動にはDNAシーケンサー377を用いた。ウィスコンシン・パッケージのblastプログラムで、得られた配列を類似性検索にかけた結果、ムスカリン性アセチルコリン・レセプターM5（GenBank Accession Number M22926）と有意の類似性を示すクローンが見出された。このクローンを工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した。

【 0 0 4 2 】

（イ）寄託機関の名称・あて名

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号（郵便番号 3 0 5 - 8 5 6 6）

（ロ）寄託日（原寄託日）：平成 9 年 1 2 月 2 5 日

（ハ）寄託番号 生命研条寄第6575号（FERM BP-6575）

【 0 0 4 3 】

次いで、この遺伝子の全長cDNAを単離するために、まず、ラット視床および視床下部由来のcDNAライブラリーを構築した。cDNAの合成は、cDNA合成キット（ストラタジーン社）のプロトコルに従い、ベクターにはpEF1x、宿主にはXL1-blue MRF'（ストラタジーン社）を使用した。

なお、pEF1xは、pcDNA3（インビトロジェン社）を以下のように改良したものである。

【 0 0 4 4 】

（1）ヒトEF1 $\alpha$ プロモーター（GenBank Accession number J04617）の調製

ヒトゲノミックDNAから、プライマー（配列番号：6／CGAGGATCCGTGAGGCTCCGGT GCCCGTC、配列番号：7／CGGGTAAGCTTCACGACACCTGAAATGGAAGA）を用いてPCRを行い、BamHI（宝酒造社）およびHindIII（宝酒造社）で消化し、プラスミドベクターpUC19（宝酒造社）にクローニングした。得られたプラスミドDNAをXhoIで消化、クレノウ酵素（宝酒造社）で末端を平滑化した後、DNAライゲーションキット

(宝酒造社) でセルフ・ライゲーションし、クローニングした。得られたプラスミドDNAをBamHIおよびHindIIIで消化し、インサート部分を回収した。

【0 0 4 5】

(2) pcDNA3の改変

プラスミドpcDNA3DNAをMluI (宝酒造社) で消化、クレノウ酵素 (宝酒造社) で末端を平滑化した後、DNAライゲーションキットでセルフ・ライゲーションし、クローニングした。得られたプラスミドDNAをAflIII (ニューイングランドバイオラボ社) およびSmaI (宝酒造社) で消化、クレノウ酵素 (宝酒造社) で末端を平滑化した後、DNAライゲーションキットでセルフ・ライゲーションし、クローニングした。得られたプラスミドDNAをBglIII (宝酒造社) およびHindIIIで消化し、CMVプロモーター部分を除いた断片を回収し、DNAライゲーションキットを用いて(1)で回収したインサート断片と連結し、クローニングした。これによりpEF1xを構築した。

【0 0 4 6】

次いで、cDNA断片の塩基配列からオリゴヌクレオチドプローブ (配列番号: 8 / CCTTCTGCATCCCATTTGTACGTACC) を合成し、ジーントラッパーcDNAポジティブセレクションシステム (ギブコBRL社) のプロトコルにしたがって、上記のように調製されたラット視床及び視床下部由来のcDNAライブラリーから、複数個のクローンを得た。次に、先に単離したクローン (FERM P-16572) に挿入されたcDNA断片をプローブにしてコロニーハイブリダイゼーションを行い、陽性のクローンを得た。このクローンを工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した。

【0 0 4 7】

(イ) 寄託機関の名称・あて名

名称: 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305-8566)

(ロ) 寄託日 (原寄託日): 平成9年12月25日

(ハ) 寄託番号 生命研条寄第6574号 (FERM BP-6574)

【0 0 4 8】

このクローンの挿入断片長は2.7kbpであった。キアプレップミディキット (キ

アゲン社)でプラスミドDNAを調製し、ショットガン法 (Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual 2nd edn., (1989)) で全塩基配列を決定した。cDNAの断片化には、密閉式超音波生物材料処理装置バイオラプター (東湘電機社) を用い、断片化したDNAを2%アガロース低融解ゲル電気泳動で分画し、0.6kbp付近の断片を、gene clean spin kit (bio101社) で精製、T4 DNAポリメラーゼ (宝酒造社) で末端を平滑化して、HincII/BAP処理pUC118ベクターにクローニングした。宿主にはXL1-Blueを用い、E.coliパルサー (バイオラッド社) で形質転換した。得られたショットガンクローンを、ダイプライマーサイクルシーケンシングキットFS (パーキンエルマー社) あるいはダイターミネーターサイクルシーケンシングキットFS (パーキンエルマー社) でシーケンシングした。得られた配列を、DNAシーケンシングソフト・シーケンチャー (日立ソフト社) で結合・編集し、全塩基配列をした。全塩基配列は、2700bpで、413アミノ酸からなるタンパク質をコードしていることが明らかになった (配列番号:5)。オープン・リーディング・フレームの5'側に停止コドンが存在するため、このcDNAは、コード領域全長を含むと考えられる (配列番号:2)。この配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1、第2、第3、第4、第5、第6および第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認された (図1)。

#### 【0049】

また、オープン・リーディング・フレームのサイズも、公知のGタンパク質共役型レセプタータンパク質と比較して同程度の約1.2kbであった。Gタンパク質共役型レセプタータンパク質はそのアミノ酸配列にある程度の共通性を示し、一つのタンパク質ファミリーを形成している。そこで、単離したcDNAによってコードされるアミノ酸配列を用いてホモロジー検索を行なったところ、公知のGタンパク質共役型レセプタータンパク質であるウシ由来ムスカリン性アセチルコリンレセプターM3タンパク質 (Lee, P. H. et al., Biochim. Biophys. Acta 1223, 151-154 (1994))、ヒト由来ムスカリン性アセチルコリンレセプターM5タンパク質 (Bonner, T. I. et al., Neuron 1, 403-410 (1988))、マウス由来 $\alpha$ 2Aアドレノセプター (Link, R. et al., Mol. Pharmacol. 42, 16-27 (1992)) とそれぞれ26%、25%、29%のホモロジーを有する全く新規なレセプタータンパク質であ

ることが判明した。

【0050】

〔実施例2〕 ヒトGタンパク質共役型受容体遺伝子の単離

得られたラットの配列をEST検索にかけたところ、ヒトホモログの断片が見出された（ジーンバンクNID：946030およびNID：901756）。ヒト胎児脳cDNAを特異的プライマーIF01（配列番号：9/CTTCCGCCGGGCCTTCACCAA）およびIR02（配列番号：10/ACAGACACGGCGGGGCTCAC）（プローブ1）を用いてPCRにより増幅した。ブランクハイブリダイゼーションの標準的な方法により、プローブ1を用いて $1.2 \times 10^6$ のサイズを有するhuman  $\lambda$  EMBL3 SP6/T7 genomic library（クロンテック社）をスクリーニングした。これにより2つの陽性クローンを単離した。得られたファージクローンをSacIで消化し、一つのクローンの3つのバンドをサブクローニングした。これをそれぞれI1（配列番号：11）、I3（配列番号：12）、およびI5（配列番号：13）と命名した。これらの断片の配列を決定し、仮想的な配列をラットのホモログとの比較により検討した。I1およびI3は、それぞれ特異的プライマーYS03（配列番号：14/TGAACGCTTCGGGGGCGCTG）およびYS05（配列番号：15/GAGATGGCGAGGTTGAGCAGG）、YS12（配列番号：16/GGCTCCAAGCCATCGGCGTC）およびYS14（配列番号：17/CTCACTTCCAGCAGTGCTCC）を用いてPCR増幅し、そのPCR産物をそれぞれプローブ2およびプローブ3と命名した。ヒト視床下部cDNA（ $1.3 \times 10^6$  ファージ）を150mmプレート当たり $5.6 \times 10^4$ の濃度でプレートに播いた。得られたサブプールをプライマーYS03およびYS05を用いたPCRによりチェックした。プローブ2を用いて、ゲノムライブラリーのスクリーニングと同様の方法で、一つの陽性サブプールをスクリーニングした。これによりTM5から5' UTRを含む一つのcDNAクローンを得て、cDNAクローン1と命名した。

【0051】

プライマーYS07（配列番号：18/GCCTCCGCACCCAGAACAAC）およびYS10（配列番号：19/TGCGCCTCTGGATGTTTCAG）を用いたPCRにより、cDNAクローン1からプローブ4を増幅した。プローブ3およびプローブ4を用いて、ゲノムライブラリーのスクリーニングと同様の方法で、ヒト海馬ライブラリー（ $3 \times 10^6$  pfu）のスクリーニングを行った。いくつかのクローンを得て、その中で最も長いものをcDNAク

ローン2と命名して、その配列の決定を行った。このクローンはTM2から3' UTRの領域を有していた。cDNAクローン1をSacIIで消化し、ベクターと5' 端領域を含む3.3kbバンドをシュリンプアルカリフォスファターゼで処理した。cDNAクローン2もまたSacIIで消化し、その1.7kbの断片をcDNAクローン1由来の3.3kb断片に結合させた。この結合された断片が挿入されたクローンを工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した。

【 0 0 5 2 】

(イ) 寄託機関の名称・あて名

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号（郵便番号 3 0 5 - 8 5 6 6）

(ロ) 寄託日（原寄託日）：平成 1 0 年 1 2 月 1 7 日

(ハ) 寄託番号 生命研条寄第6609号（FERM BP-6609）

【 0 0 5 3 】

決定されたヒト「BG2」cDNAの塩基配列を配列番号：21に、該cDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：20に示す。

【 0 0 5 4 】

ヒト「BG2」タンパク質は、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるヒト由来 $\alpha$ -2C-1アドレノセプター（Regan, J. W. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85, 6301-6305(1988)）、マウス由来 $\beta$ -1アドレノセプター（Jasper J. R. et al., Biochem. Biophys. Acta 1178, 307-309(1993)）、ヒト由来ムスカリン性アセチルコリンレセプターM3（Peralta, E. G. et al., EMBO J. 6, 3923-3929(1987)）とそれぞれ32 %、28 %、27%のホモロジーを有していた。

【 0 0 5 5 】

[実施例 3] ノーザンブロット解析

ヒト「BG2」の検出においては、プローブ4を $^3\text{H}$ -dCTP（Amersham, Prime II）で標識し、cDNAプローブとして用いた。また、ブロット膜としては、MTN（Human Multiple Tissue Northern）ブロット（クロンテック社）を用いた。ExpressHyb solution（クロンテック社）中で68℃で30分のプレハイブリダイゼーション後、68℃で1時間プローブを膜にハイブリダイズさせた（最終プローブ濃

度は $1.5 \times 10^6$  cpm/ml)。0.1% SDSを含む2xSSCで42℃で30分、そのブロットを洗浄し、最終的な洗浄を0.1% SDSを含む0.1xSSCで50℃で30分行った。次いで、そのブロットを-80℃で2.5日間、コダックのオートラジオグラフィックフィルムに暴露した。

【0056】

一方、マウスBG2の検出においては、プローブの調製は、ラット「BG2」cDNAを鋳型に、センスプライマーMF2（配列番号：22/TGCATCCCATTGTACGTNCC）およびアンチセンスプライマーMR1（配列番号：24/TGCTCTGGGACACCATCTTC）を用いてPCRで増幅後、増幅産物をアガロース電気泳動で精製し、上記ヒトと同様に標識することにより調製した。

【0057】

また、ブロット膜としては、Rat MTN (Multiple Tissue Northern) ブロット（クロンテック社）を用いた。ハイブリダイゼーション緩衝液（50% ホルムアミド、4xSSPE、1% SDS、0.5% BLOTTO、100  $\mu$ g/ml サケ精子DNA）中で、42℃にて一晩のハイブリダイゼーションを行った。洗浄は、0.1% SDSを含む0.1xSSCで65℃で行った。次いで、そのブロットを-80℃で一晩、コダックのオートラジオグラフィックフィルムに暴露した。その結果、ヒトおよびラット由来の「BG2」遺伝子の発現は、特に脳において強く検出された（図2）。

【0058】

〔実施例4〕 In situハイブリダイゼーション

13から18歳の成体雄Sprague-Dawley rats (Charles River Japan社) をエーテルの吸入により麻酔し、ロータリーポンプに接続し、左心室に挿入したカニューレを通じて、冷却した4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液（pH7.2）中を注入した。灌流後、脳、脳下垂体、および脊髄を取り出し、矢状方向にまたは冠状に切断した。組織標本を4℃で夜通し、同様の固定剤で固定した。次の過程はRNAseの混入を避けるため、注意して行った。組織試料を常法にてパラフィンワックスで包埋し、回転ミクロトーム（Model HM 355; MICROM Laborgerate GmbH）を用いて6  $\mu$ mの厚さのパラフィン切片を作製した。切片はIn situハイブリダイゼーションを実施するまで-20℃で無湿状態で保存した。



【 0 0 5 9 】

ラットBG2センスおよびアンチセンスRNAプローブの調製のために、センスプライマーMF2（配列番号：22／TGCATCCCATTGTACGTNCC）およびアンチセンスプライマーMR3（配列番号：23／ATCATTAGGAGCGTGTANGG）を用いてMP21プラスミドDNAからPCR増幅したcDNA断片をpZErO-2ベクター（インビトロジェン社）にクローニングした。RNAプローブは、DIG RNA Labeling Kit（ベーリンガー・マンハイム社）を用いてジギトキシゲニンで標識した。パラフィン切片をキシレンで脱パラフィンし、段階的エタノール系列で洗浄し、蒸留水に移した。ジギトキシゲニンで標識したRNAプローブを含まないIn situハイブリダイゼーション試薬としては、In situ Hybridization Reagents（ISHR, Code No. 316-01951; ニッポンジーン社）を用いた。切片は緩衝液（PBS; ISHR1）を用いて1分間と10分間の2回インキュベートした。切片を37℃で10分間、プロテイナーゼK（ISHR6）で処理した。氷酢酸（ISHR4）を含むアセチル化緩衝液（ISHR3）を用いてアセチル化を15分間行い、次いで、PBS／グリシン緩衝液（ISHR2）を用いて室温で20分のクエンチング後、4xSSC（ISHR5）で10分間、2回洗浄し、次いで、PBS緩衝液で10分間洗浄した。50%ホルムアミド／2xSSCを用いて室温で30分のプレハイブリダイゼーション後、ジギトキシゲニンで標識したRNAプローブ（1  $\mu$ g/ml）を用いて42℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。

【 0 0 6 0 】

ハイブリダイゼーション後の洗浄は、ホルムルムアミド／2xSSCを用いて42℃で10分間を2回行った。それから切片を37℃で5分間、NET緩衝液（ISHR9）で洗浄後、RNaseA（ISHR10）／NET緩衝液（ISHR9）を用いて37℃で30分間、RNase処理を行った。0.1xSSC緩衝液（ISHR11）で20分間、2回洗浄後、切片を移し、標識したジギトキシゲニンを、Digoxigenin Detection Kit（ベーリンガー・マンハイム社）を用いて検出した。切片を100mM Tris-HCl, 150mM NaClを含む緩衝液（緩衝液1）で室温で1分間洗浄し、室温下、ブロッキング試薬（緩衝液2）で30分間インキュベートした。切片は、アルカリフォスファターゼ標識された抗ジギトキシゲニン抗体を用いて室温で60分間インキュベートした。緩衝液1を用いて15分間、緩衝液3を用いて2分間、室温で洗浄後、切片を緩衝液3で希釈したNBT/Xリン酸

溶液と室温で12から14時間インキュベートした。緩衝液4で洗浄後、切片はグリセロールまたはパーマウント (Permount) で封入した。

【0 0 6 1】

その結果、図3および図4に示すように、BG2 cDNAプローブは、海馬および脊髄で強くハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションはまた、視床下部、視床および小脳においても中程度のハイブリダイゼーションシグナルが検出された。

【0 0 6 2】

[実施例5] BG2発現細胞作製

BG2発現ベクターは、pIRESneoおよびpIREShyg (CLONTECH社) を利用して作製した。BG2遺伝子をクローン化しやすいように、pIRESneoのネオマイシン耐性遺伝子を、pIREShygのハイグロマイシン耐性遺伝子と置換したプラスミドを作製し、これにヒトBG2遺伝子をクローン化し、発現ベクターとした。

【0 0 6 3】

このヒトBG2発現ベクターを、CRE配列の下流にベータラクタマーゼの遺伝子がつながった遺伝子を持つHEK293細胞 (Aurora社より購入) にリポフェクション法により遺伝子導入した。遺伝子導入にはLipofectamine PLUS reagent (GIBCO-BRL社) を用い、実験操作は添付のマニュアルに従った。

【0 0 6 4】

BG2発現細胞をハイグロマイシン添加培地中に放置することにより選択し、ハイグロマイシン添加培地で生育してきた細胞をBG2発現細胞としてファンクショナルアッセイに用いた。なお、BG2遺伝子の発現はRT-PCR法により確認した。

【0 0 6 5】

[実施例6] 細胞内cAMP濃度の測定

細胞内cAMP濃度の測定は、Zlokarmikらの方法 (Science 1998, vol.279, p.84) を用いた。Zlokarmikらの方法は細胞内のcAMP濃度上昇に依存して下流遺伝子の転写活性を上昇させる配列 (CRE: cAMP responceible element) の下流にベータラクタマーゼ遺伝子をつないだ遺伝子を導入し、この細胞内のcAMP濃度の変化により転写翻訳されたベータラクタマーゼの活性を添加した蛍光基質の蛍光変化を測定することにより細胞内cAMP濃度を測定するものである。

【 0 0 6 6 】

さらに7回膜貫通型レセプターにおける結合Gタンパク質を介した細胞内cAMP濃度の減少を測定するため、フォルスコリンを添加して細胞内cAMP濃度に依存したベータラクタマーゼ活性を上昇させ、リガンドが作用した際のベータラクタマーゼ活性の減少から細胞内cAMP濃度の減少を測定した。

【 0 0 6 7 】

上記レポーター遺伝子とBG2レセプターを発現させた細胞をPBS(-)緩衝液(GIBCO-BRL社)で2回洗浄した後、Cell-dissociation buffer (GIBCO-BRL社)を添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37度で3分間保温し、培養フラスコを軽くたたいて細胞をフラスコから遊離させた。遠心操作により細胞を回収後、0.1%BSA(シグマ社)を含むOpti-MEM培地(GIBCO-BRL社)に懸濁し細胞数を測定し、 $8 \times 10^4$ 細胞/mlに調整した。

【 0 0 6 8 】

あらかじめ、各種薬剤100  $\mu$ g/mlを含むDMSO溶液1  $\mu$ lに、最終濃度0.5  $\mu$ Mになるようにフォルスコリン(シグマ社)を加えた0.1%BSA(シグマ社)を含むOpti-MEM培地(GIBCO-BRL社)50  $\mu$ lを添加し反応溶液とした。この反応溶液に上記の細胞数に調整した細胞を50  $\mu$ l添加し反応を開始し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37度で3時間保温した。

【 0 0 6 9 】

つぎにAurora社から購入したキットを用いてA液[1mM CCF2-AM / dry DMSO溶液]:12  $\mu$ l、B液[100mg/ml Pluronic 127, 0.1% acetic acid in DMSO]:120  $\mu$ l、C液[24% w/w PEG-400, 18% TR40, water])2mlの割合で混ぜ色素導入緩衝液を調整し、上記反応液に色素導入緩衝液20  $\mu$ lを添加・室温に1時間放置してベータラクタマーゼの基質となる蛍光色素(CCF2-AM)を細胞内に導入し、励起波長409nm、蛍光波長460nm(CCF分解物)および530nm(CCF)を測定し、(EM460/EM530)を求めることにより細胞内cAMP濃度変化を測定した。

【 0 0 7 0 】

各種薬剤を1  $\mu$ g/mlの濃度で被験したところ、BG2発現細胞はヒスタミンによりコントロールの35%(コントロールの比の値を100, フォルスコリン無しの比の

値を0とした場合)まで、EM460/EM530の比の値が低下した。同様な現象はヒスタミンアナログアゴニストであるR(-)- $\alpha$ -メチルヒスタミン、イメティット (imetit) 及びN- $\alpha$ -メチルヒスタミンでも観察された(図5)。すなわちBG2発現細胞ではヒスタミンにより細胞内cAMP濃度が低下した。このヒスタミンによる細胞内cAMP濃度低下現象はBG2発現細胞特異的な現象で、何も発現させていないコントロールの細胞では観察されなかった。

【0071】

また他の被験薬剤(ムスカリン性アセチルコリンレセプターのアゴニストであるカルバコール、セロトニンレセプターのアゴニストであるセロトニン、ドーパミンレセプターのアゴニストであるドーパミンなど)は、1 $\mu$ g/mlの薬剤濃度を用いても、細胞内cAMP濃度の低下は観察されなかった。このことからBG2レセプターはヒスタミンレセプターであることが示された。

なお、実験に用いた化合物を下記表1に示す。

【0072】

【表1】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	Albuterol hemisulfate	DSP-4 hydrochloride	Phenoxylbenzamine hydrochloride	(S)-Chlorpheniramine maleate	(-)-Epinephrine bitartrate	Histamine, 1-methyl-, dihydrochloride	Methoxamine hydrochloride	Oxymetazoline hydrochloride	Phenylephrine hydrochloride	Thioperamide maleate
B	Alprenolol hydrochloride	Benexdramine tetrahydrochloride	Bretium tosylate	(S)-CGP-12177A hydrochloride	None	Hydrochlorothiazide	(S)-Normetanephrine hydrochloride	Prazosin hydrochloride	None	Tripelennamine hydrochloride
C	(S)-Atenolol	MHPG sulfate potassium	BU224 hydrochloride	Clonidine dihydrochloride	None	(S)-Isoproterenol hydrochloride	L(-)-Norepinephrine bitartrate	(S)-Pindolol	Protriptyline hydrochloride	S(-)-Timolol maleate
D	Agmatine sulfate	6-Fluoro-norepinephrine hydrochloride	B-HT 933 dihydrochloride	Cirazoline hydrochloride	Guanabenz acetate	p-Iodoclonidine hydrochloride	None	Prazobind	Promethazine hydrochloride	Urapidil hydrochloride
E	AGN 192403 hydrochloride	Xylamine hydrochloride	B-HT 920 dihydrochloride	CGP 20712A methanesulfonate	L-Histidine hydrochloride	ICI 118,551 hydrochloride	Nisoxetine hydrochloride	Pindolol	Ranitidine hydrochloride	UK 14,304
F	Clonidine hydrochloride	Benoxathian hydrochloride	BRL 37344 sodium	Dimaprit dihydrochloride	Histamine dihydrochloride	Imetit dihydrobromide	Nylidrin hydrochloride	(S)-Propranolol hydrochloride	Rauwolfazine hydrochloride	Xylazine hydrochloride
G	p-Amino-clonidine hydrochloride	MHPG piperazine	CGS-12086A dimaleate	Diphenhydramine hydrochloride	Histamine, R(-)- $\alpha$ -methyl-, dihydrochloride	Metanephrine hydrochloride	Naloxidil dihydrochloride	Pyrimine maleate	SKF 91486 dihydrochloride	Yohimbine hydrochloride
H	(S)-threo-DOPS	WB-4101 hydrochloride	Cimetidine	Dobutamine hydrochloride	Histamine, N- $\alpha$ -methyl-, dihydrochloride	(-)- $\alpha$ -Methyl-norepinephrine	(S)-Octopamine hydrochloride	Phentolamine mesylate	Triprolidine hydrochloride	YS-035 hydrochloride

【0073】

【実施例7】 ヒスタミン結合実験

ヒスタミンアナログアゴニストである、R(-)- $\alpha$ -メチルヒスタミンを用いて、結合実験を行った。BG2レセプターを発現させた細胞をPBS(-)緩衝液(GIBCO-BRL社)で2回洗浄した後、Cell-dissociation buffer(GIBCO-BRL社)を添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37度で3分間保温し、培養フラスコを軽くたたいて細胞を

フラスコから遊離させた。遠心操作により細胞を回収後、アッセイバッファー（Hanks' Balanced Salt Solution [GIBCO-BRL社]，10mM Hepes [ナカライ社]，0.1% BSA [シグマ社]，pH7.4 [NaOHにより調整]）に懸濁し細胞数を測定し、最終濃度 $0.6 \times 10^6$ 細胞／m l になるように調整した。細胞を上記アッセイバッファー中で0.2nM R(-)- $\alpha$ -メチル[イミダゾール-2,5(n)-3H]ヒスタミン（アマシャム社）と37度で30分間保温し、あらかじめ0.5% ポリエチレンイミン（和光社）で処理したUnifilter plate GF/B（パッカード）で細胞を収集した。非特異的な細胞へのヒスタミンアナログの結合は、2  $\mu$ M R(-)- $\alpha$ -メチルヒスタミン（RBI社）共存下で測定した。その結果、BG2発現細胞では、全結合：非特異的結合が4.4：1、BG2を発現していないコントロールの細胞では、1.2：1で、非特異的結合量は発現細胞でも、非発現細胞でもほとんど変わらなかった。このことから、BG2レセプターは特異的に、ヒスタミンアナログと結合することが示された。

【0074】

【発明の効果】

本発明により、脳に発現する新規なGタンパク質共役型レセプタータンパク質およびその遺伝子が提供された。これにより該レセプタータンパク質を利用したリガンドや医薬品の候補化合物のスクリーニングが可能となった。これらリガンドや医薬品の候補化合物は、例えば、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を介したシグナル伝達系の異常などに起因する疾患の診断や治療などへの利用が期待される。

【0075】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD.

萬有製薬株式会社

<120> G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

新規なグアノシン三リン酸（GTP）結合タンパク質共役型のレセプター

タンパク質

<130> B1-103

<140>

<141>

<150> World Intellectual Property Organization

<151> PCT/JP98/05967

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 413

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 1

Met Glu Arg Ala Pro Pro Asp Gly Leu Met Asn Ala Ser Gly Thr Leu

1

5

10

15

Ala Gly Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Phe Ser Ala Ala

20

25

30

Trp Thr Ala Val Leu Ala Ala Leu Met Ala Leu Leu Ile Val Ala Thr

35

40

45

Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Met Leu Ala Phe Val Ala Asp Ser Ser  
50 55 60

Leu Arg Thr Gln Asn Asn Phe Phe Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp  
65 70 75 80

Phe Leu Val Gly Ala Phe Cys Ile Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu  
85 90 95

Thr Gly Arg Trp Thr Phe Gly Arg Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val  
100 105 110

Val Asp Tyr Leu Leu Cys Ala Ser Ser Val Phe Asn Ile Val Leu Ile  
115 120 125

Ser Tyr Asp Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala  
130 135 140

Gln Gln Gly Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Ala Leu Val Trp  
145 150 155 160

Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr  
165 170 175

Leu Ser Gly Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe  
180 185 190

Phe Tyr Asn Trp Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe  
195 200 205

Thr Pro Phe Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn  
210 215 220

Ile Gln Arg Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Gly Arg Glu Ala Gly  
225 230 235 240

Pro Glu Pro Pro Pro Asp Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Ala Pro Pro  
245 250 255

Ser Cys Trp Gly Cys Trp Pro Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu  
260 265 270

His Ser Ser Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu  
275 280 285

Lys Arg Gly Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg  
290 295 300

Met Lys Met Val Ser Gln Ser Ile Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg  
305 310 315 320

Asp Lys Lys Val Ala Lys Ser Leu Ala Ile Ile Val Ser Ile Phe Gly  
325 330 335

Leu Cys Trp Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys  
340 345 350

His Gly Arg Cys Ile Pro Asp Tyr Trp Tyr Glu Thr Ser Phe Trp Leu



355

360

365

Leu Trp Ala Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His

370

375

380

Tyr Ser Phe Arg Arg Ala Phe Thr Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu

385

390

395

400

Lys Val Gln Pro His Gly Ser Leu Glu Gln Cys Trp Lys

405

410

<210> 2

<211> 1239

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1239)

<400> 2

atg gag cgc gcg ccg ccc gac ggg ctg atg aac gcg tcg ggc act ctg 48

Met Glu Arg Ala Pro Pro Asp Gly Leu Met Asn Ala Ser Gly Thr Leu

1

5

10

15

gcc gga gag gcg gcg gct gca ggc ggg gcg cgc ggc ttc tcg gct gcc 96

Ala Gly Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Phe Ser Ala Ala

20

25

30

tgg acc gct gtc ctg gct gcg ctc atg gcg ctg ctc atc gtg gcc aca 144

Trp Thr Ala Val Leu Ala Ala Leu Met Ala Leu Leu Ile Val Ala Thr

35

40

45

gta ctg ggc aac gcg ctg gtc atg ctc gcc ttc gtg gcg gat tcg agc 192

Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Met Leu Ala Phe Val Ala Asp Ser Ser

50

55

60

ctc cgc acc cag aac aac ttc ttt ctg ctc aac ctc gcc atc tcc gac 240

Leu Arg Thr Gln Asn Asn Phe Phe Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp

65

70

75

80

ttc ctc gtg ggt gcc ttc tgc atc cca ttg tac gta ccc tat gtg ctg 288

Phe Leu Val Gly Ala Phe Cys Ile Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu

85

90

95

acc ggc cgt tgg acc ttc ggc cgg ggc ctc tgc aag ctg tgg ctg gtg 336

Thr Gly Arg Trp Thr Phe Gly Arg Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val

100

105

110

gta gac tac cta ctg tgt gcc tcc tcg gtc ttc aac atc gta ctc atc 384

Val Asp Tyr Leu Leu Cys Ala Ser Ser Val Phe Asn Ile Val Leu Ile

115

120

125

agc tat gac cga ttc ctg tca gtc act cga gct gtc tcc tac agg gcc 432

Ser Tyr Asp Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala

130

135

140

cag cag ggg gac acg aga cgg gcc gtt cgg aag atg gca ctg gtg tgg 480  
Gln Gln Gly Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Ala Leu Val Trp  
145 150 155 160

gtg ctg gcc ttc ctg ctg tat ggg cct gcc atc ctg agt tgg gag tac 528  
Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr  
165 170 175

ctg tct ggt ggc agt tcc atc ccc gag ggc cac tgc tat gct gag ttc 576  
Leu Ser Gly Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe  
180 185 190

ttc tac aac tgg tac ttt ctc atc acg gcc tcc acc ctc gag ttc ttc 624  
Phe Tyr Asn Trp Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe  
195 200 205

acg ccc ttc ctc agc gtt acc ttc ttc aac ctc agc atc tac ctg aac 672  
Thr Pro Phe Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn  
210 215 220

atc cag agg cgc acc cgc ctt cgg ctt gat ggg ggc cgt gag gct ggc 720  
Ile Gln Arg Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Gly Arg Glu Ala Gly  
225 230 235 240

cca gaa ccc cca cca gat gcc cag ccc tcg cca cct cca gct ccc ccc 768  
Pro Glu Pro Pro Pro Asp Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Ala Pro Pro  
245 250 255

agc tgc tgg ggc tgc tgg cca aaa ggg cat ggc gag gcc atg ccg ttg 816

Ser Cys Trp Gly Cys Trp Pro Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu

260

265

270

cac agc tct ggc agc tcc tca agg ggc act gag agg cca cgc tca ctc 864

His Ser Ser Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu

275

280

285

aaa agg ggc tcc aag cca tca gca tct tca gca tcc ctg gag aag cgc 912

Lys Arg Gly Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg

290

295

300

atg aag atg gtg tcc cag agc atc acc cag cgc ttc cgg ctg tcg cgg 960

Met Lys Met Val Ser Gln Ser Ile Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg

305

310

315

320

gac aag aag gtg gcc aag tcg ctg gcc atc atc gtg agc atc ttt ggg 1008

Asp Lys Lys Val Ala Lys Ser Leu Ala Ile Ile Val Ser Ile Phe Gly

325

330

335

ctc tgc tgg gcg ccg tac acg ctc cta atg atc atc cga gct gct tgc 1056

Leu Cys Trp Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys

340

345

350

cat ggc cgc tgc atc ccc gat tac tgg tac gag acg tcc ttc tgg ctt 1104

His Gly Arg Cys Ile Pro Asp Tyr Trp Tyr Glu Thr Ser Phe Trp Leu

355

360

365

ctg tgg gcc aac tcg gcc gtc aac ccc gtc ctc tac cca ctg tgc cac 1152

Leu Trp Ala Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His

370

375

380

tac agc ttc cgc aga gcc ttc acc aag ctc ctc tgc ccc cag aag ctc 1200

Tyr Ser Phe Arg Arg Ala Phe Thr Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu

385

390

395

400

aag gtc cag ccc cac ggc tcc ctg gag cag tgc tgg aag

1239

Lys Val Gln Pro His Gly Ser Leu Glu Gln Cys Trp Lys

405

410

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 3

batngccaac ctbkcttct c

21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

synthesized primer sequence

<400> 4

ccataaaagn nggggttgac

20

<210> 5

<211> 2700

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (351)..(1589)

<400> 5

aattcggcac gagcgggcag atcgcggggc gcactcggtt gcgcgctgag ctaggggtgc 60

accgacgcac cgcgggcggc tggagctcgg ctttgctctc gctgcagcag ccgcgccgcc 120

cgccccactc cgctcagatt ccgacaccag cccctcttgg atcgccctcc tggactctag 180

cccgggctct tgctccgacc ccgcggacca tgctccgggc gccccccgga aaaccgggct 240

gggcgaagag ccggcaaaga ttaggctcac gagcgggggc cccaccggc caccagctc 300

tccgcccgtg ccctgcccgg tgtccccgag ccgtgtgagc ctgctgggcc atg gag 356

Met Glu

1

cgc gcg ccg ccc gac ggg ctg atg aac gcg tcg ggc act ctg gcc gga 404  
Arg Ala Pro Pro Asp Gly Leu Met Asn Ala Ser Gly Thr Leu Ala Gly

5 10 15

gag gcg gcg gct gca ggc ggg gcg cgc ggc ttc tcg gct gcc tgg acc 452  
Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Phe Ser Ala Ala Trp Thr

20 25 30

gct gtc ctg gct gcg ctc atg gcg ctg ctc atc gtg gcc aca gta ctg 500  
Ala Val Leu Ala Ala Leu Met Ala Leu Leu Ile Val Ala Thr Val Leu

35 40 45 50

ggc aac gcg ctg gtc atg ctc gcc ttc gtg gcg gat tcg agc ctc cgc 548  
Gly Asn Ala Leu Val Met Leu Ala Phe Val Ala Asp Ser Ser Leu Arg

55 60 65

acc cag aac aac ttc ttt ctg ctc aac ctc gcc atc tcc gac ttc ctc 596  
Thr Gln Asn Asn Phe Phe Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu

70 75 80

gtg ggt gcc ttc tgc atc cca ttg tac gta ccc tat gtg ctg acc ggc 644  
Val Gly Ala Phe Cys Ile Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu Thr Gly

85 90 95

cgt tgg acc ttc ggc cgg ggc ctc tgc aag ctg tgg ctg gtg gta gac 692  
Arg Trp Thr Phe Gly Arg Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val Val Asp

100 105 110

tac cta ctg tgt gcc tcc tcg gtc ttc aac atc gta ctc atc agc tat 740

Tyr Leu Leu Cys Ala Ser Ser Val Phe Asn Ile Val Leu Ile Ser Tyr  
115 120 125 130

gac cga ttc ctg tca gtc act cga gct gtc tcc tac agg gcc cag cag 788  
Asp Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala Gln Gln  
135 140 145

ggg gac acg aga cgg gcc gtt cgg aag atg gca ctg gtg tgg gtg ctg 836  
Gly Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Ala Leu Val Trp Val Leu  
150 155 160

gcc ttc ctg ctg tat ggg cct gcc atc ctg agt tgg gag tac ctg tct 884  
Ala Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr Leu Ser  
165 170 175

ggt ggc agt tcc atc ccc gag ggc cac tgc tat gct gag ttc ttc tac 932  
Gly Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe Phe Tyr  
180 185 190

aac tgg tac ttt ctc atc acg gcc tcc acc ctc gag ttc ttc acg ccc 980  
Asn Trp Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe Thr Pro  
195 200 205 210

ttc ctc agc gtt acc ttc ttc aac ctc agc atc tac ctg aac atc cag 1028  
Phe Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn Ile Gln  
215 220 225

agg cgc acc cgc ctt cgg ctt gat ggg ggc cgt gag gct ggc cca gaa 1076  
Arg Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Gly Arg Glu Ala Gly Pro Glu



230	235	240	
ccc cca cca gat gcc cag ccc tcg cca cct cca gct ccc ccc agc tgc			1124
Pro Pro Pro Asp Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Ala Pro Pro Ser Cys			
245	250	255	
tgg ggc tgc tgg cca aaa ggg cat ggc gag gcc atg ccg ttg cac agc			1172
Trp Gly Cys Trp Pro Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu His Ser			
260	265	270	
tct ggc agc tcc tca agg ggc act gag agg cca cgc tca ctc aaa agg			1220
Ser Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu Lys Arg			
275	280	285	290
ggc tcc aag cca tca gca tct tca gca tcc ctg gag aag cgc atg aag			1268
Gly Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg Met Lys			
295	300	305	
atg gtg tcc cag agc atc acc cag cgc ttc cgg ctg tcg cgg gac aag			1316
Met Val Ser Gln Ser Ile Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg Asp Lys			
310	315	320	
aag gtg gcc aag tcg ctg gcc atc atc gtg agc atc ttt ggg ctc tgc			1364
Lys Val Ala Lys Ser Leu Ala Ile Ile Val Ser Ile Phe Gly Leu Cys			
325	330	335	
tgg gcg ccg tac acg ctc cta atg atc atc cga gct gct tgc cat ggc			1412
Trp Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys His Gly			
340	345	350	

cgc tgc atc ccc gat tac tgg tac gag acg tcc ttc tgg ctt ctg tgg	1460
Arg Cys Ile Pro Asp Tyr Trp TyrGlu Thr Ser Phe Trp Leu Leu Trp	
355                      360                      365                      370	
gcc aac tcg gcc gtc aac ccc gtc ctc tac cca ctg tgc cac tac agc	1508
Ala Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His Tyr Ser	
375                      380                      385	
ttc cgc aga gcc ttc acc aag ctc ctc tgc ccc cag aag ctc aag gtc	1556
Phe Arg Arg Ala Phe Thr Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu Lys Val	
390                      395                      400	
cag ccc cac gcc tcc ctg gag cag tgc tgg aag tgagcagctg cccaccctt	1609
Gln Pro His Gly Ser Leu Glu Gln Cys Trp Lys	
405                      410	
ctgaggccag gcccttgtac ttgtttgagt gggcagccgg agcgtgggcg gggccctggt	1669
ccatgctccg ctccaaatgc catggcggcc tcttagatca tcaaccccg c agtggggtag	1729
catggcaggt gggccaagag ccctagttag tggagctaga gtgtgctggt tagctctgcc	1789
gccacattct ccttcaccac acagaagaga caatccagga gtcccaggca tgccttcac	1849
ctacacacac acacacacac acacacacac acacaccaca gtgcagtgcc agtgatgtcc	1909
ccctttgcat atttagtggt tgggtgctct cctaatagcaa acctcggtgt gtgctcccg	1969

ctccggccct ggcaatgcgt gcgtgcgccc tgcattgtgct cacacccgcc acacacccgc	2029
ccgccacaca cttgcaacac ctctctcttc ccagaagagc tggggacgat gccctttgct	2089
gccactgtct cttgcttaat ccagagacct ggctccttat cccccactct cccttcaact	2149
ctgccccaca aagtgtcgag cgcctcggga aacttgaagc ttctctgctc ctccactct	2209
ggatgttttc aggaagatgg aggagaagaa aacacgtctg tgaacttgat gticcttgga	2269
tgtttaatca agagagacaa aattgccgag gagctcgggg ctggattggc aggtgtgggc	2329
tcccacgccc tctccctca gtgctgcagc ttccggctga gccgcgccag ctgcttctgc	2389
ctgccccgcc ccaggttg ggacgatggc cctgccctgc ttgccccgtc tgtacaatca	2449
gaatttgggg gtgggtggtt atggggtaga gcggctcttc actgtgccct aaaggtcctg	2509
aggctcacag gacagtcagc aggagagcag gcaggccgc gacacctggg aggaatgctt	2569
tgccctgtcc tgtgtactca cctcaggctt ctgcatgctc tgctgccctt gtgccctggt	2629
gtgctgcctc tgccaatgtg aaaacacaat aaagtgtatt tttttacgga aaaaaaana	2689
aaaaaaaaa a	2700

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 6

cgaggatccg tgaggctccg gtgcccgtc

29

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 7

cgggtaagct tcacgacacc tgaaatggaa ga

32

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

synthesized primer sequence

<400> 8

ccttctgcat cccattgtac gtacc

24

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 9

cttccgccgg gccttcacca a

21

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 10

acagacacgg cggggctcac

20

<210> 11

<211> 1350

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

<222> (280)..(557)

<400> 11

gcactcggct gcgcgttgcg tccggctgca cggtcgcacc ggcagcggct caggctccgg 60

ctcctctccc gctgcagcag ccgcgctgcc ggccccactg ggctcggatc cggccccggc 120

cccctcggca ccgcctgctc tggccccggc cccggccccg cggaccatgc gctgggcgcc 180

cccaggggaa cccgaccggg ccaaggggccc gcaaagacga ggctcccggg ccggggcccc 240

tcccggccgc ccagctctcg gccggcgccc tgccccgcgt cccggagccg cgtgagcctg 300

cgggggccatg gagcgcgcg cgcgccagcg gccgctgaac gcttcggggg cgctggcggg 360

cgaggcggcg gcggcgggcg gggcgcgcg cttctcggca gcctggaccg cggctgctggc 420

cgcgctcatg gcgctgctca tcgtggccac ggtgctgggc aacgcgctgg tcatgctcgc 480

cttcgtggcc gactcgagcc tccgcacca gaacaattc ttctgctca acctcgccat 540

ctccgacttc ctcgtcggta aatccccagc ccctggccgc tggggaccca ggggcgcccc 600

gcgtggccgg gccagcgggg actggaacac ggacctgggt ggctcccga ggcacacgcc 660

ccaccagggg acccggcctg ggaagggggc gtccggagcc catggggtgg ggggcacagg 720

cgaagtictt tgccactcag gcctcgggac aggggctggg gagagatgtc cccgggaagg 780

gacacgggca ctgggcgagg cgcaaggcgc aaaggcagcg ggtgcagctc tggctcctgc 840

gctgtagcca aacaaaggct gctgcggact taggacgcgc ggagggcgca gtggggcggt 900

ttagagaagg tctgggggag gggacatgga agggggattt ttagagctgt gttgggggaa 960

gggacggttg ggaagggtgg ggttggggga gacgctcgga ggagcgtgct ctacagtgtc 1020

caggctctgc tgccggctgg ggggcggggc acgcggaggg ggctggagcg ccagacacct 1080

gttggggctg tgaggtgcgt ctcccagacg ctccaagccc gcttggcagt agtagtagcg 1140

gctggcggct ggcggctgca accaagtgcc ctttcagcca ggagaaaggc tttctccttg 1200

tctaagctga gaccgagggt tgtccagcgc cagggtaggg gctggagtcc agcggggggag 1260

gggagaagga aattgtcttc tttctcctt tgagggctgg gagggctgga cagaagtcca 1320

gggaatcccg actccaggct ctcgggggtc 1350

<210> 12

<211> 448

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

<222> (259)..(425)

<400> 12

gagctcccca tgcctggatc atccctcctg cccccaggcc caggggacac agatagtgt 60

gggagctatg tgggggtgaa ggctggcggc agggcagagt ttgtggctga caccagggtgg 120

aggggttgta agatgaggat ggctagtcc agaaaagcag ccacatgtg accccaggtc 180

ccgccggtgt ctgcgcttag gtccgtctgt cccctggccc ctggctgcat ggtcccactg 240

tggccctact cccacaggc gccttctgca tccactgta tgtaccctac gtgctgacag 300

gccgctggac ctccggccgg ggcctctgca agctgtggct ggtagtggac tacctgctgt 360

gcacctcctc tgccttcaac atcgtgctca tcagctacga ccgcttcctg tcggtcaccc 420

gagcgggtgag tcctgggctg cggagctc 448

<210> 13

<211> 1893



<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

<222> (293)..(1209)

<400> 13

gagctcacag ctggtagggg gtggtaaaca ggcagcctag cagagagtga gggttcaggt 60

tggtcccagg gagcttctga ggctctcact gagtgtggca gggcaccagt ccgggacccc 120

agtggggagg gttagaggaa gggaggggaa agagggaggg agggaggaca ggaggggaaa 180

ggaggagcat tgctgctgag ggaaggggccc acataggggc ccacaggcta cgggggcgca 240

cccagcccaa tattccttcc gccccgcccc tgaccagcct gcccttctgc aggtctcata 300

ccgggcccag cagggtgaca cgcggcgggc agtgcggaag atgctgctgg tgtgggtgct 360

ggccttcctg ctgtacggac cagccatcct gagctgggag tacctgtccg ggggcagctc 420

catccccgag ggccactgct atgccgagtt ctctacaac tggtaacttc tcatcacggc 480

ttccaccctg gagttcttta cgccttctc cagcgtcacc ttctttaacc tcagcatcta 540

cctgaacatc cagaggcgca cccgcctccg gctggatggg gctcgagagg cagccggccc 600

cgagccccct cccgagggcc agccctcacc acccccaccg cctggctgct ggggctgctg 660

gcagaagggg cacggggagg ccatgccgct gcacaggtat ggggtgggtg aggcggccgt 720

aggcgtgag gccggggagg cgacctcgg ggggtggcgt gggggcggct ccgtggcttc 780

accacctcc agctccggca gctcctcgag gggcactgag aggccgcgct cactcaagag 840

gggctccaag ccatcggcgt cctcggcctc actggagaag cgcatgaaga tgggtgtccca 900

gagcttcacc cagcgttttc ggctgtctcg ggacaggaaa gtggccaagt cgctggccgt 960

catcgtgagc atctttgggc tctgctgggc ccatacacg ctgctgatga tcatccgggc 1020

cgcttgccat ggccactgcg tccctgacta ctggtacgaa acctccttct ggctcctgtg 1080

ggccaactcg gctgtcaacc ctgtcctcta ccctctgtgc caccacagct tccgccgggc 1140

cttcaccaag ctgctctgcc ccagaagct caaaatccag cccacagct ccctggagca 1200

ctgctggaag tgagtggccc accagagcct ccctcagcca cgctctcttc agcccaggtc 1260

tcctgggcat ctggccctgc tgccccctac ccggtcgtt ccccagggg tgagccccgc 1320

cgtgtctgtg gccctctctt aatgccacgg cagccacct gccatggagg cgcttcctg 1380

ggttggccag agggccccctc actggctgga ctggaggctg ggtggccggc cctgcccccc 1440

acattctggc tccaccggga gggacagtct ggaggtccca gacatgctgc ccacccccctg 1500

ctggtgccc a cccttcgcag ttactgggtg gtgtttctcc caaagcaagc acctgggtgt 1560

gctccaggct tcctgcccta gcagtttgcc tctgcacgtg cacacacctg cacacccctg 1620

cacacacctg cacaccgtcc ctctccccgg acaagcccag gacactgcct ttgctgcctt 1680

ctgtctcttg cataagcctc aggccctggcc ctttcacccc tcttcccacc aactctctct 1740

gcccccaaaa gtgtcaaggg gccctaggaa cctcgaagct gttctctgct ttccattctt 1800

gggtgttttc agaaagatga agaagaaaac atgtctgtga acttgatgtt cctgggatgt 1860

ttaatcaaga gagacaaaat tgctgaggag ctc 1893

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 14

tgaacgcttc gggggcgctg 20

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 15

gagatggcga ggttgagcag g

21

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 16

ggctccaagc catcggcgtc

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 17

ctcacttcca gcagtgtctcc

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 18

gcctccgcac ccagaacaac

20

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 19

tgcgcctctg gatgttcag

19

<210> 20

<211> 453

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Glu Arg Ala Pro Pro Asp Gly Pro Leu Asn Ala Ser Gly Ala Leu

1 5 10 15

Ala Gly Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Phe Ser Ala Ala

20 25 30

Trp Thr Ala Val Leu Ala Ala Leu Met Ala Leu Leu Ile Val Ala Thr

35 40 45

Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Met Leu Ala Phe Val Ala Asp Ser Ser

50 55 60

Leu Arg Thr Gln Asn Asn Phe Phe Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp

65 70 75 80

Phe Leu Val Gly Ala Phe Cys Ile Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu

85 90 95

Thr Gly Arg Trp Thr Phe Gly Arg Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val

100 105 110

Val Asp Tyr Leu Leu Cys Thr Ser Ser Ala Phe Asn Ile Val Leu Ile

115 120 125

Ser Tyr Asp Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala  
130 135 140

Gln Gln Gly Asp Thr Arg Arg Ala Val Arg Lys Met Leu Leu Val Trp  
145 150 155 160

Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr Gly Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr  
165 170 175

Leu Ser Gly Gly Ser Ser Ile Pro Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe  
180 185 190

Phe Tyr Asn Trp Tyr Phe Leu Ile Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe  
195 200 205

Thr Pro Phe Leu Ser Val Thr Phe Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn  
210 215 220

Ile Gln Arg Arg Thr Arg Leu Arg Leu Asp Gly Ala Arg Glu Ala Ala  
225 230 235 240

Gly Pro Glu Pro Pro Pro Glu Ala Gln Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro  
245 250 255

Gly Cys Trp Gly Cys Trp Gln Lys Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu  
260 265 270

His Arg Tyr Gly Val Gly Glu Ala Ala Val Gly Ala Glu Ala Gly Glu  
275 280 285

Ala Thr Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Val Ala Ser Pro Thr  
290 295 300

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Arg Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu  
305 310 315 320

Lys Arg Gly Ser Lys Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg  
325 330 335

Met Lys Met Val Ser Gln Ser Phe Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg  
340 345 350

Asp Arg Lys Val Ala Lys Ser Leu Ala Val Ile Val Ser Ile Phe Gly  
355 360 365

Leu Cys Trp Ala Pro Tyr Thr Leu Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys  
370 375 380

His Gly His Cys Val Pro Asp Tyr Trp Tyr Glu Thr Ser Phe Trp Leu  
385 390 395 400

Leu Trp Ala Asn Ser Ala Val Asn Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His  
405 410 415

His Ser Phe Arg Arg Ala Phe Thr Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu  
420 425 430

Lys Ile Gln Pro His Ser Ser Leu Glu His Cys Trp Lys Lys Met Lys



435

440

445

Lys Lys Thr Cys Leu

450

<210> 21

<211> 2050

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (271)..(1629)

<400> 21

agagatgtag ggcgccccctt ttagctgcgc acagaacgaa agaactcggtt ttttctttaa 60

gtgagtgtgc ttgggtgacg cttagggcgc cctccgcagt gcgcgcagga aagcgcaactg 120

aggctgcgga ggcagagctg catgctgggt gcgggaagag gtgggctccg tcgcggagtc 180

gctgagtccg tgccctttta gttagtcttg cagtctagta tggctcccat ttgcccttcc 240

actcccggag ccgcgtgagc ctgcggggcc atg gag cgc gcg ccg ccc gac ggg 294

Met Glu Arg Ala Pro Pro Asp Gly

1

5

ccg ctg aac gct tcg ggg gcg ctg gcg ggc gag gcg gcg gcg gcg ggc 342

Pro Leu Asn Ala Ser Gly Ala Leu Ala Gly Glu Ala Ala Ala Ala Gly

10	15	20	
ggg gcg cgc ggc ttc tgc gca gcc tgg acc gcg gtg ctg gcc gcg ctc	390		
Gly Ala Arg Gly Phe Ser Ala Ala Trp Thr Ala Val Leu Ala Ala Leu			
25	30	35	40
atg gcg ctg ctc atc gtg gcc acg gtg ctg ggc aac gcg ctg gtc atg	438		
Met Ala Leu Leu Ile Val Ala Thr Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Met			
	45	50	55
ctc gcc ttc gtg gcc gac tgc agc ctc cgc acc cag aac aac ttc ttc	486		
Leu Ala Phe Val Ala Asp Ser Ser Leu Arg Thr Gln Asn Asn Phe Phe			
	60	65	70
ctg ctc aac ctc gcc atc tcc gac ttc ctc gtc ggc gcc ttc tgc atc	534		
Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Gly Ala Phe Cys Ile			
	75	80	85
cca ctg tat gta ccc tac gtg ctg aca ggc cgc tgg acc ttc ggc cgg	582		
Pro Leu Tyr Val Pro Tyr Val Leu Thr Gly Arg Trp Thr Phe Gly Arg			
	90	95	100
ggc ctc tgc aag ctg tgg ctg gta gtg gac tac ctg ctg tgc acc tcc	630		
Gly Leu Cys Lys Leu Trp Leu Val Val Asp Tyr Leu Leu Cys Thr Ser			
105	110	115	120
tct gcc ttc aac atc gtg ctc atc agc tac gac cgc ttc ctg tgc gtc	678		
Ser Ala Phe Asn Ile Val Leu Ile Ser Tyr Asp Arg Phe Leu Ser Val			
	125	130	135

acc cga gcg gtc tca tac cgg gcc cag cag ggt gac acg cgg cgg gca 726

Thr Arg Ala Val Ser Tyr Arg Ala Gln Gln Gly Asp Thr Arg Arg Ala

140

145

150

gtg cgg aag atg ctg ctg gtg tgg gtg ctg gcc ttc ctg ctg tac gga 774

Val Arg Lys Met Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Phe Leu Leu Tyr Gly

155

160

165

cca gcc atc ctg agc tgg gag tac ctg tcc ggg ggc agc tcc atc ccc 822

Pro Ala Ile Leu Ser Trp Glu Tyr Leu Ser Gly Gly Ser Ser Ile Pro

170

175

180

gag ggc cac tgc tat gcc gag ttc ttc tac aac tgg tac ttc ctc atc 870

Glu Gly His Cys Tyr Ala Glu Phe Phe Tyr Asn Trp Tyr Phe Leu Ile

185

190

195

200

acg gct tcc acc ctg gag ttc ttt acg ccc ttc ctc agc gtc acc ttc 918

Thr Ala Ser Thr Leu Glu Phe Phe Thr Pro Phe Leu Ser Val Thr Phe

205

210

215

ttt aac ctc agc atc tac ctg aac atc cag agg cgc acc cgc ctc cgg 966

Phe Asn Leu Ser Ile Tyr Leu Asn Ile Gln Arg Arg Thr Arg Leu Arg

220

225

230

ctg gat ggg gct cga gag gca gcc ggc ccc gag ccc cct ccc gag gcc 1014

Leu Asp Gly Ala Arg Glu Ala Ala Gly Pro Glu Pro Pro Pro Glu Ala

235

240

245

cag ccc tca cca ccc cca ccg cct ggc tgc tgg ggc tgc tgg cag aag 1062

Gln Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro Gly Cys Trp Gly Cys Trp Gln Lys

250

255

260

ggg cac ggg gag gcc atg ccg ctg cac agg tat ggg gtg ggt gag gcg 1110

Gly His Gly Glu Ala Met Pro Leu His Arg Tyr Gly Val Gly Glu Ala

265

270

275

280

gcc gta ggc gct gag gcc ggg gag gcg acc ctc ggg ggt ggc ggt ggg 1158

Ala Val Gly Ala Glu Ala Gly Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Gly Gly

285

290

295

ggc ggc tcc gtg gct tca ccc acc tcc agc tcc ggc agc tcc tcg agg 1206

Gly Gly Ser Val Ala Ser Pro Thr Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Arg

300

305

310

ggc act gag agg ccg cgc tca ctc aag agg ggc tcc aag ccg tcg gcg 1254

Gly Thr Glu Arg Pro Arg Ser Leu Lys Arg Gly Ser Lys Pro Ser Ala

315

320

325

tcc tcg gcc tcg ctg gag aag cgc atg aag atg gtg tcc cag agc ttc 1302

Ser Ser Ala Ser Leu Glu Lys Arg Met Lys Met Val Ser Gln Ser Phe

330

335

340

acc cag cgc ttt cgg ctg tct cgg gac agg aaa gtg gcc aag tcg ctg 1350

Thr Gln Arg Phe Arg Leu Ser Arg Asp Arg Lys Val Ala Lys Ser Leu

345

350

355

360

gcc gtc atc gtg agc atc ttt ggg ctc tgc tgg gcc cca tac acg ctg 1398

Ala Val Ile Val Ser Ile Phe Gly Leu Cys Trp Ala Pro Tyr Thr Leu

365

370

375

ctg atg atc atc cgg gcc gcc tgc cat ggc cac tgc gtc cct gac tac 1446

Leu Met Ile Ile Arg Ala Ala Cys His Gly His Cys Val Pro Asp Tyr

380

385

390

tgg tac gaa acc tcc ttc tgg ctc ctg tgg gcc aac tcg gct gtc aac 1494

Trp Tyr Glu Thr Ser Phe Trp Leu Leu Trp Ala Asn Ser Ala Val Asn

395

400

405

cct gtc ctc tac cct ctg tgc cac cac agc ttc cgc cgg gcc ttc acc 1542

Pro Val Leu Tyr Pro Leu Cys His His Ser Phe Arg Arg Ala Phe Thr

410

415

420

aag ctg ctc tgc ccc cag aag ctc aaa atc cag ccc cac agc tcc ctg 1590

Lys Leu Leu Cys Pro Gln Lys Leu Lys Ile Gln Pro His Ser Ser Leu

425

430

435

440

gag cac tgc tgg aaa aag atg aag aag aaa aca tgt ctg tgaacttgat 1639

Glu His Cys Trp Lys Lys Met Lys Lys Lys Thr Cys Leu

445

450

gttcctggga tgtttaatca agagagacaa aattgctgag gagctcaggg ctggattggc 1699

aggtgtgggc tcccacgcc tcttccctcc gctaaggctt ccggtgagc tgtgccagct 1759

gcttctgccc accccgcctc tgggctcaca ccagccctgg tggccaagcc tgccccggcc 1819

actctgtttg ctcacccagg acctctgggg gttgttggga ggagggggcc cggctgggcc 1879

cgagggtccc aaggcgtgca ggggcgggtcc agaggaggtg cccgggcagg ggccgcttcg 1939

ccatgtgctg tgcacccgtg ccacgcgtc tgcattgctc tctgcctgtg cccgctgcgc 1999

tgccctgcaa accgtgaggt cacaataaag tgtatttttt tattggtgct g 2050

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 22

tgcattcccat tgtacgtgcc 20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 23

atcattagga gcgtgtangg

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 24

tgctctggga caccatcttc

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、マウス「BG2」タンパク質の疎水性プロットを示す。図中の1乃至7の番号はGタンパク質共役型レセプタータンパク質の特徴的な7つの疎水性領域（膜貫通領域）を示す。また、図下の番号は「BG2」タンパク質のアミノ酸の番号を示す。

【図 2】 図 2 は、ヒトおよびマウス「BG2」遺伝子の発現の組織特異性をノーザンプロット解析した結果を示す。

【図 3】 図 3 は、脳におけるマウス「BG2」遺伝子の発現の局在をIn situハイブリダイゼーションにより解析した結果を示す。

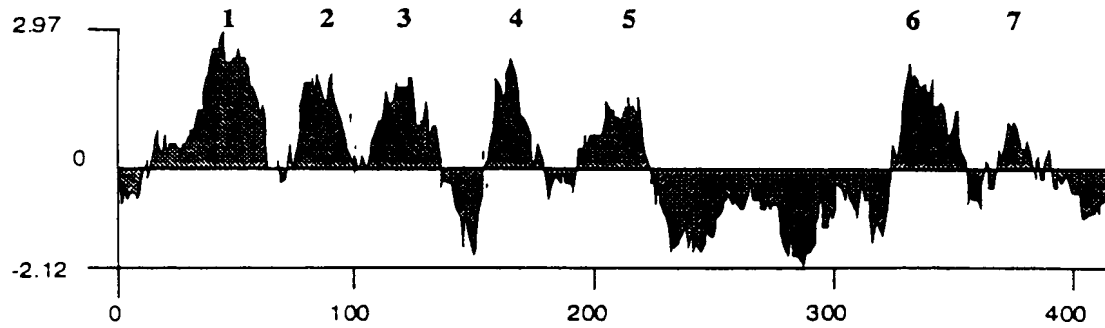
【図 4】 図 4 は、脊髄におけるマウス「BG2」遺伝子の発現の局在をIn situハイブリダイゼーションにより解析した結果を示す。「センス」はセンスRNAプローブ（mRNAとハイブリダイズしない；ネガティブコントロール）を用いてハイブリダイゼーションを行った結果、「アンチセンス」はアンチセンスRNAプローブ（mRNAとハイブリダイズする）を用いてハイブリダイゼーションを行った結果を示す。

【図 5】 各種薬剤をヒト「BG2」発現細胞に作用させ、その後のcAMP濃度の変化を検出した結果を示す。アデニル酸サイクレースの活性化剤であるフォルスコリンにより、細胞内cAMP濃度を上昇させ（レーン：control）、各種被験薬を作用させた場合の細胞内cAMP濃度の変化をZlokarmikらの方法（Science 1998, vol.279, p.84）を用いて測定した（レーン：A1～H10）。フォルスコリンを作用させない場合の細胞内cAMP濃度レベルは、レーン：baseに示した。

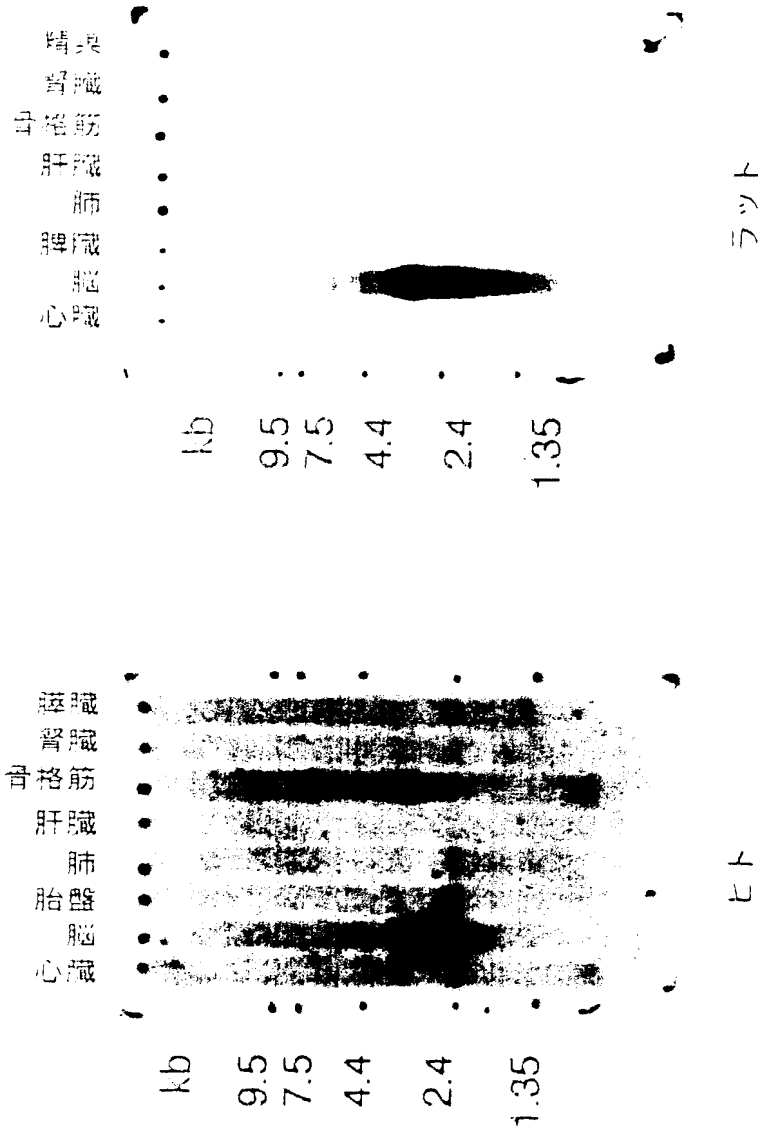


【書類名】 図面

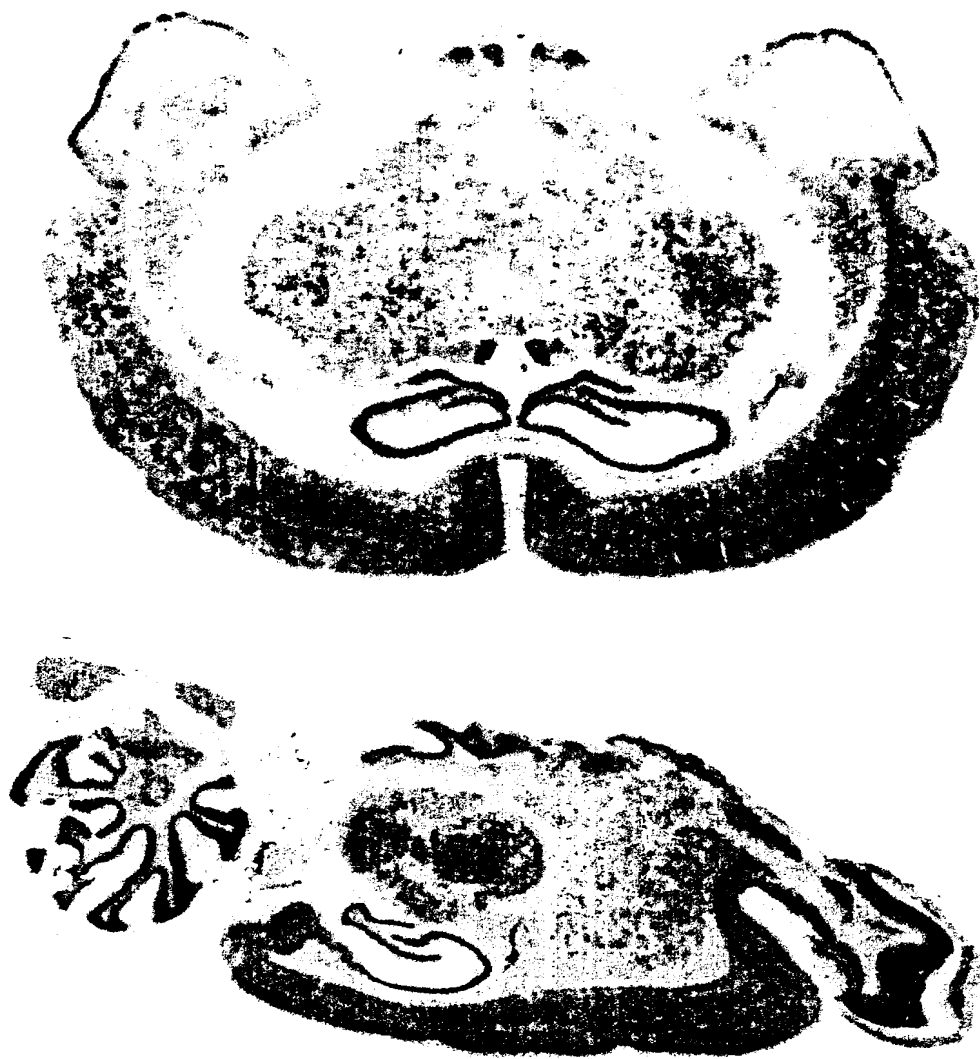
【図 1】



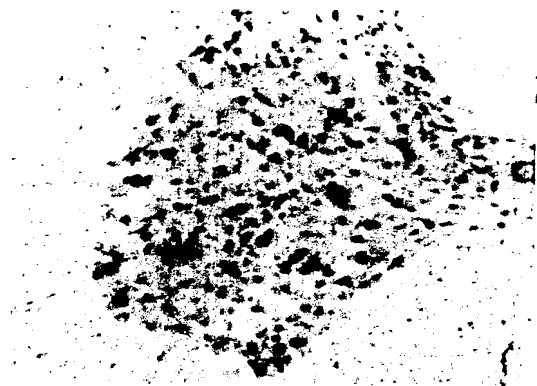
【図 2】



【図 3】



【図 4】

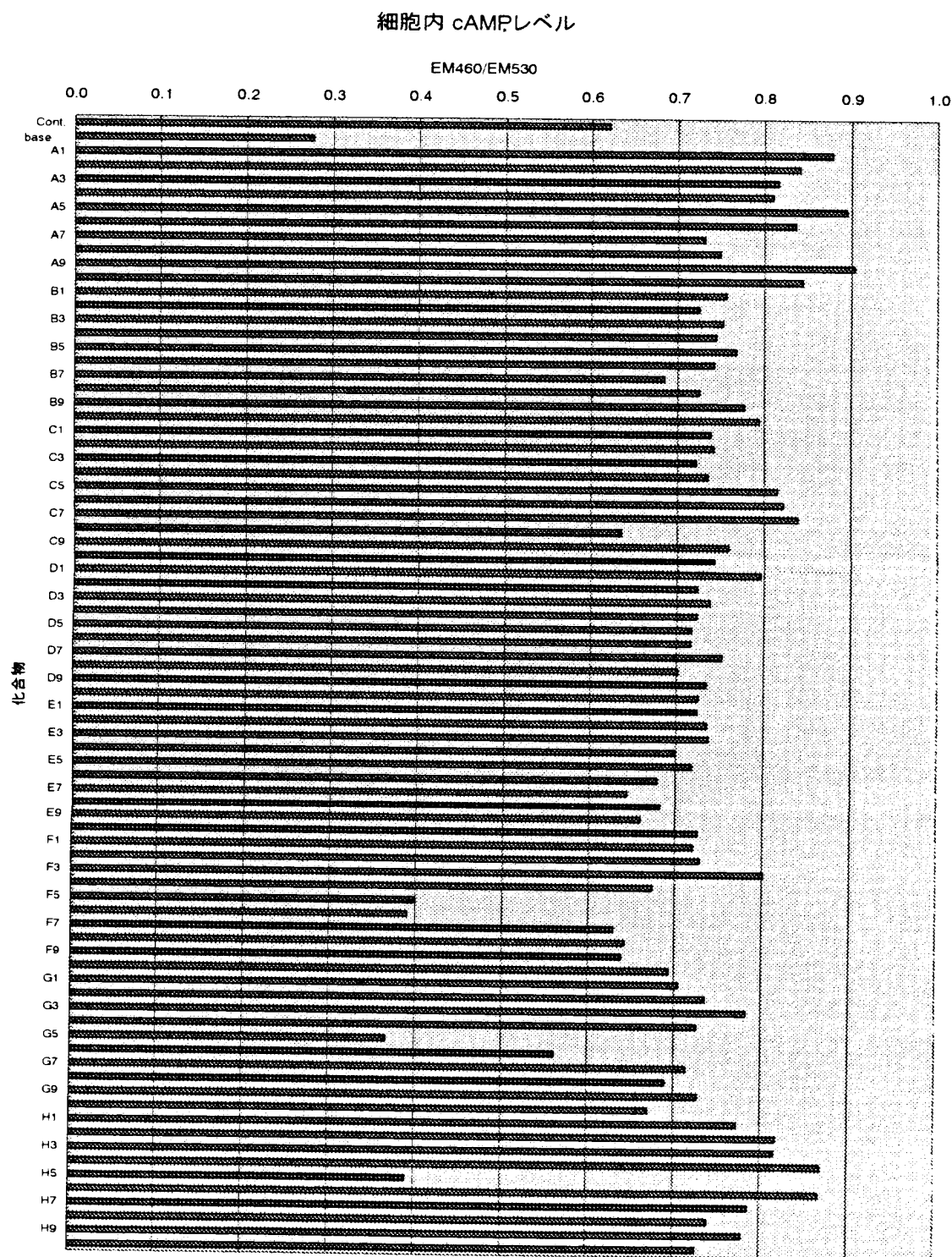


アンチセンス



センス

【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 脳に発現する新規なヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を提供する。

【解決手段】 ヒト海馬ライブラリーのスクリーニングによりヒト由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードする全長cDNAを単離した。該タンパク質は、ヒスタミン刺激により細胞内cAMP濃度を低下させる活性を有していた。このGタンパク質共役型レセプタータンパク質は、そのリガンドのスクリーニングや該タンパク質からのシグナル伝達を調節しうる医薬品候補化合物のスクリーニングのためのツールとして利用しうる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005072]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋本町2丁目2番3号

氏 名 萬有製薬株式会社